



Mediadores del metabolismo de lípidos en el tejido adiposo y muscular: Las adipomioquinas PTX3 y CCDC80 y la proteína de unión de ácidos grasos FATP1

Óscar Osorio Conles



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- Compartiqual 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - Compartiqual 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-ShareAlike 3.0. Spain License.**

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE BIOLOGIA

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

**MEDIADORES DEL METABOLISMO DE LÍPIDOS EN EL
TEJIDO ADIPOSEO Y MUSCULAR: LAS
ADIPOMIOQUINAS PTX3 Y CCDC80, Y LA PROTEÍNA DE
UNIÓN DE ÁCIDOS GRASOS FATP1**

Óscar Osorio Conles
Barcelona, septiembre 2014



UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE BIOLOGIA

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

Memoria presentada por Óscar Osorio Conles para optar al grado de
Doctor por la Universidad de Barcelona.

Programa de Doctorado de Biotecnología.
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.

MEDIADORES DEL METABOLISMO DE LÍPIDOS EN EL
TEJIDO ADIPOSO Y MUSCULAR: LAS
ADIPOMIOQUINAS PTX3 Y CCDC80, Y LA PROTEÍNA DE
UNIÓN DE ÁCIDOS GRASOS FATP1

Tesis Doctoral que presenta Óscar Osorio Conles, dirigida por la
Dra. Ana María Gómez Foix

La directora de la Tesis

El doctorando

Dra. Ana M^a Gómez Foix

Óscar Osorio Conles

A mis padres y a mis abuelas.
A mis tíos y primos.
A mis compañeros de piso y viaje.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1/ Obesidad y enfermedades asociadas	3
2/ Tejido adiposo blanco: almacenamiento y movilización de reservas lipídicas	5
3/ Tipos de depósitos y fracciones adiposas. Enfermedades asociadas	6
3.1/ Depósitos grasos en tejido adiposo	6
3.1.1/ Grasa abdominal visceral.....	6
3.1.2/ Grasa abdominal subcutánea.....	7
3.1.3/ Grasa subcutánea gluteofemoral.....	8
3.1.4/ Grasa submucosal cervical.....	8
3.1.5/ Grasa rodeando al corazón.....	9
3.1.6/ Grasa perivascular.....	10
3.1.7/ Grasa rodeando al riñón y en el seno renal.....	10
3.2/ Depósitos grasos ectópicos	10
3.2.1/ Grasa en el hígado.....	11
3.2.2/ Grasa intramuscular.....	12
3.2.3/ Grasa en los cardiomiocitos.....	13
4/ Señalización de insulina y T2DM	14
4.1/ Regulación metabólica por insulina: mecanismos	14
4.2/ Resistencia a la insulina: mecanismos	17
5/ Resistencia a insulina en la obesidad	19
5.1/ Resistencia a insulina inducida por lípidos. Papel del músculo esquelético	19
5.1.1/ Pasos limitantes en la captación mitocondrial y la oxidación de ácidos grasos. FATP1.....	23
5.2/ Inflamación inducida por estrés del retículo endoplasmático	25
5.3/ Mediadores en inflamación	26
5.3.1/ Citoquinas y quimiocinas.....	26
5.3.2/ Resistencia a insulina inducida por inflamación.....	27

5.3.3/ Propagación de la inflamación. Inflamación sistémica.....	32
6/ Las adipocinas. Desregulación en la resistencia insulina.....	34
6.1/ Adipsina.....	34
6.2/ Resistina.....	34
6.3/ Leptina.....	35
6.4/ Adiponectina.....	36
6.5/ Adipolina.....	37
6.6/ Adipo-mioquinas.....	38
6.6.1/ Pentraxina 3.....	38
6.6.2/ CCDC80.....	42
OBJETIVOS.....	45
PUBLICACIONES.....	53
P1/ Plasma PTX3 Protein Levels Inversely Correlate with Insulin Secretion and Obesity, whereas Visceral Adipose Tissue PTX3 Gene Expression is Increased in Obesity.....	55
P2/ Adipose Tissue and Plasma CCDC80 Protein in Relation to Human Obesity.....	67
P3/ Fatty Acid Transport Protein 1 (FATP1) Localizes in Mitochondria in Mouse Skeletal Muscle and Regulates Lipid and Ketone Body Disposal.....	105
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	125
CONCLUSIONES.....	147
ABREVIATURAS.....	151
BIBLIOGRAFÍA.....	55

INTRODUCCIÓN

1/ Obesidad y enfermedades asociadas

La OMS define la obesidad como la acumulación anormal o excesiva de grasa que puede comprometer la salud. Se considera obesa a una persona con un BMI igual o superior a los 30 kg/m². A menudo se la asocia con una inflamación crónica de bajo grado y es causa de desórdenes metabólicos como son la resistencia a insulina, la T2DM y enfermedades cardiovasculares [1].

Por otro lado, el llamado síndrome metabólico (MetS, síndrome X o de la resistencia a insulina, se refiere a un conjunto de desórdenes correlacionados que incluyen diversas anomalías metabólicas. Para la OMS, este síndrome debe estar compuesto de resistencia a insulina, definida como intolerancia a la glucosa, un desajuste en los niveles basales de glucosa o T2DM más, al menos, de dos de los siguientes estados: elevados niveles plasmáticos de TAGs, bajos niveles plasmáticos de colesterol HDL, elevado BMI, hipertensión, o altos niveles de albúmina en la orina [2].

Sin embargo, se ha observado que la distribución de la grasa corporal, los perfiles metabólicos y el grado de asociación de estos parámetros con el riesgo cardiovascular varían ampliamente entre individuos obesos e incluso no obesos. Actualmente los datos sugieren que la distribución de los depósitos grasos puede ser un mejor predictivo de enfermedad cardiovascular que la obesidad en sí misma [1,3]. De esta forma, la acumulación grasa en la región visceral abdominal juega un papel importante en el desarrollo de riesgo cardiometabólico y se la considera un factor primordial en el desarrollo de la resistencia a insulina, encontrándose que aproximadamente un 80% de los individuos con T2DM tienen sobrepeso u obesidad [4]. Por otra parte, los depósitos dentro del hígado y músculo se asocian con la resistencia a insulina y fenotipos metabólicos adversos, de forma independiente a la adiposidad total [5]; y la grasa pericárdica se asocia con la aterosclerosis coronaria [6]. Por el contrario, los depósitos grasos en determinadas áreas pueden tener efectos protectores frente al riesgo metabólico, como la acumulación en la región glúteo femoral, asociada a un menor riesgo cardiometabólico [7].

En la última década, se ha pasado de considerar al tejido adiposo blanco (WAT) como un depósito pasivo de energía a valorarlo como un tejido dinámico que secreta factores y dirige señales a otros tejidos, implicándose a nivel sistémico en la modulación del metabolismo de lípidos, la acción de la insulina, la homeostasis metabólica, la inmunidad y hasta la reproducción [4]. Estos factores son llamados adipocinas y derivan tanto de la fracción adipocitaria como de la fracción estromovascular embebida en la matriz adiposa, que incluye preadipocitos, fibroblastos y macrófagos [8]. La desregulación de la inmunidad innata, específicamente mediante la infiltración y la activación de los macrófagos tisulares, es la responsable primaria del incremento en la inflamación tisular observada en ratones y humanos obesos [9]. Se produce entonces una sobreexpresión de una serie de indicadores de inflamación sistémica, como son el recuento de leucocitos, las concentraciones séricas y plasmáticas de proteínas de fase aguda, citoquinas proinflamatorias, quimiocinas, moléculas solubles de adhesión y mediadores protrombóticos, pero de forma modesta, no superando normalmente el doble de sus niveles normales [10]. Los criterios diagnósticos para la inflamación de bajo grado no han sido definidos con precisión, pero su expresión fenotípica no se discute. De esta forma, la inflamación crónica de bajo grado proporciona una ruta molecular que relaciona la obesidad con la resistencia a insulina y la secuela de ésta, la arteriopatía coronaria.

En última instancia, la incapacidad de los adipocitos para mantener el balance de FAs en plasma deriva en desequilibrios en el contenido lipídico de células no adiposas, que en condiciones normales estaría altamente restringido. Esto puede resultar en una disfunción celular, apoptosis y otras secuelas patológicas. Pese a que el tejido adiposo cumple un papel esencial en la regulación de los niveles de FAs, la capacidad del adipocito para oxidarlos es apenas un 10% de la del músculo esquelético, y dicho porcentaje no varía significativamente en la obesidad o la resistencia a insulina [11]. De forma simplificada, cuando se desregula la captación de FAs y la lipogénesis de novo supera a su oxidación, se produce un incremento en su almacenamiento celular, en primera instancia en el WAT y, una vez superada su capacidad de almacenamiento, como grasa ectópica.

2/ Tejido adiposo blanco: almacenamiento de reserva lipídicas

Los adipocitos sintetizan TAGs a partir de FAs provenientes de las lipoproteínas, quilomicrones y VLDL circulantes y éstos constituyen la reserva energética a partir de la que se liberan los FAs. El paso de su liberación desde las lipoproteínas está limitado por la velocidad de las lipasas para hidrolizarlos, lo que dependerá del número de LPLs activas rodeando la partícula –aunque en condiciones normales están presentes en exceso- y por la velocidad con la que los FAs resultantes pueden ser retirados del microambiente capilar. De no ser eficientemente retirados y acumularse en los capilares, la actividad LPL será inhibida y se reducirá la lipólisis. Además los quilomicrones y las LPL se liberarán de la superficie endotelial prematuramente sin que todos los TAGs sean hidrolizados, generándose un remanente de quilomicrones ricos en TAGs [12]. Los FAs que no consiguen entrar en el adipocito pasan al torrente sanguíneo hasta alcanzar el hígado (Fig. 1), donde también serán retenidos los remanentes de quilomicrones, cuyos FAs contribuirán al flujo hepático de FAs. Existe por tanto una relación inversa entre los FAs captados por el adipocito y los que alcanzan el hígado y el músculo [13].

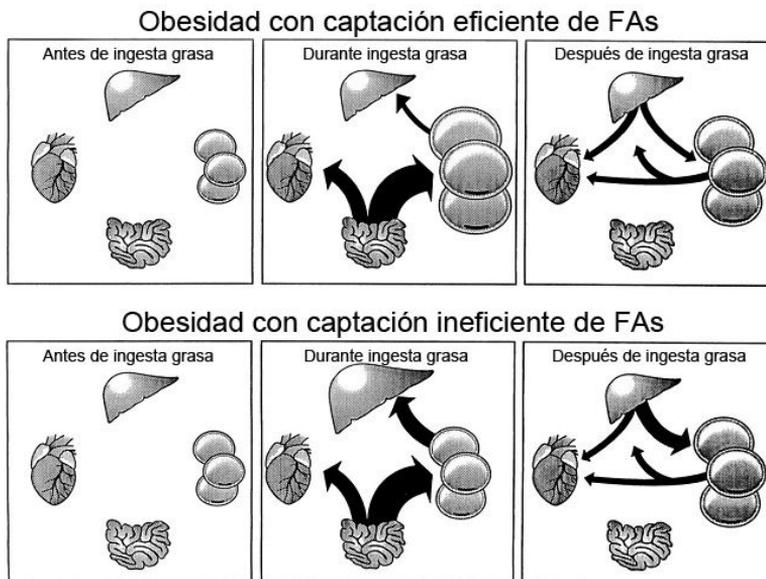


Figura 1. Consecuencias de la ingesta excesiva de FAs, tanto en obesidad con una captura eficaz de FAs, como en obesidad con una captura ineficaz. En ambos casos la ingesta de FAs en exceso conduce a una expansión de la masa adiposa. *Adaptado de [13].*

En el tejido adiposo, la insulina aumenta la actividad de la PDH y la ACC al defosforilarlas. La velocidad con la que se lleva a cabo esta síntesis está modulada, además de por la insulina, por la ASP, que facilita la incorporación de los FAs al adipocito [13]. Si su actividad decae en este tejido, una mayor cantidad de FAs son derivados al hígado, donde se estimulará la síntesis de VLDL. Cuando los adipocitos se diferencian, adquieren la capacidad de sintetizar los precursores de la ASP y, a medida que crecen en tamaño, también aumentan paralelamente su capacidad de síntesis de TAGs, su capacidad para sintetizar ASP y especialmente su capacidad de respuesta a ésta [13]. Mientras que los adipocitos de gran tamaño se vuelven menos sensibles a la insulina, permanecen sensibles a la ASP.

3/ Tipos de depósitos y fracciones adiposas. Enfermedades asociadas

Desde el punto de vista funcional, se pueden considerar depósitos grasos tanto aquellos acúmulos que actúan principalmente de forma sistémica –adiposo endocrino-, como la grasa visceral abdominal o intrahepática, o aquellos que lo hacen de forma local –adiposo paracrino-, como es la pericárdica. Desde el punto de vista anatómico, podemos diferenciar aquellos depósitos grasos que tienen lugar en el propio tejido adiposo, de aquellos que se producen en otros tejidos no especializados –grasa ectópica-. Así, se pueden distinguir [14]:

3.1/ Depósitos grasos en tejido adiposo

3.1.1/ Grasa abdominal visceral

Una de las teorías que se proponen para explicar la relación entre el VAT y el riesgo vascular y cardiometabólico es la “hipótesis portal” o de la vena porta. Ésta propone que un incremento de la actividad lipolítica en el depósito de grasa visceral y en la demanda al hígado de FAs es la causante de la resistencia a insulina [15]. Varios estudios han demostrado que los niveles de *turnover* de FAs y de lipólisis son mayores en el depósito visceral que en el subcutáneo, que el VAT es menos sensible al efecto antilipolítico de la insulina [16], y que es necesaria la infusión local de concentraciones mucho mayores de insulina para reprimir la lipólisis en el VAT abdominal [17]. Esta

acumulación de grasa visceral junto a una elevada actividad de lipólisis en los adipocitos del VAT podría llevar a un mayor flujo de FAs al hígado y la exposición crónica de éste a altos niveles de FAs podría promover indirectamente la gluconeogénesis en el hígado [18], frenar la oxidación de FAs e incrementar la lipogénesis hepática [19]; incrementar el contenido hepático de TAGs [20]; así como reducir la liberación de insulina en la célula β pancreática [21].

La acumulación de grasa en el VAT suele ir acompañada de una inflamación de bajo grado observable tanto en el parénquima como en las células inmunes infiltradas [22], que liberan una batería de factores con efectos tanto sistémicos como locales, que llevan a la insulinoresistencia y aterosclerosis [5]. De forma independiente a la composición corporal, tanto la hiperplasia como la hipertrofia de los adipocitos viscerales aumentan el riesgo de hipertrigliceridemia. El tejido adiposo hipertrofiado se caracteriza por una alta infiltración de macrófagos convirtiéndose en un gran reservorio de citoquinas inflamatorias como el TNF α y la IL-6, principales estimuladores de la producción de la CRP por parte del hígado. La suma de estos factores modularía la función de los macrófagos llevando al desarrollo de la placa aterosclerótica en la pared arterial [23].

3.1.2/ Grasa abdominal subcutánea

No existe el mismo consenso a la hora de asociar el SAT con el riesgo cardiometabólico. Los resultados, hasta la fecha, no han conseguido mostrar si cumpliría un papel de riesgo o protector respecto a la salud cardiometabólica. El SAT, respecto al VAT, es un depósito menos celular, menos vascularizado, contiene menos células inflamatorias e inmunes, tiene una mayor capacidad de diferenciación preadipocitaria y un menor número de adipocitos de gran tamaño [5]. En este sentido, una de las interpretaciones posibles podría ser que cumple un efecto protector, ya que la expansión de SAT en detrimento de otros depósitos de grasa ectópica podría ser metabólicamente favorable [24].

3.1.3/ Grasa subcutánea gluteofemoral

Los depósitos grasos en la porción inferior del cuerpo difieren de los anteriores en términos de lipólisis y captación de FAs, y se han propuesto como un factor de protección respecto al desequilibrio en el metabolismo de la glucosa y los lípidos aterogénicos, al incrementar el consumo energético mediante el almacenamiento de FAs a largo plazo [25]. Pese a encontrar una actividad lipoproteín-lipasa relativamente alta en este tejido, sus adipocitos aislados presentan una baja sensibilidad a los estímulos lipolíticos [25].

Además, se ha asociado a estos depósitos con perfiles más favorables de secreción de adipocinas [7], al encontrarse correlaciones positivas con los niveles circulantes de leptina [26] y adiponectina [27], así como con menores niveles de expresión de citoquinas inflamatorias [7]. Por último, se ha observado que células madre derivadas de este depósito son altamente multipotentes, conservando la capacidad de diferenciarse en distintos tipos de celulares, lo que les permitiría reparar o sustituir diversos tejidos [28].

En conclusión, el SAT gluteofemoral ofrece protección frente a la resistencia a insulina y riesgo CVD al permitir la expansión de sus adipocitos frente al exceso energético de la dieta. Una vez la capacidad funcional normal del tejido adiposo ha sido rebasada, el exceso de lípidos pasaría a ser almacenado en otros depósitos de grasa ectópica, incluyendo tejidos no adiposos, como son el hígado, el músculo o las células beta, acrecentando la insulinoresistencia y la disfunción de las células pancreáticas.

3.1.4/ Grasa submucosal cervical

Hasta la fecha, se había asociado el depósito adiposo en el cuello con el desarrollo del síndrome de apnea [29]. Más recientemente, se ha propuesto como un factor de riesgo vascular y cardiometabólico, al revelarse que la circunferencia cervical está directamente asociada con otros factores de riesgo cardiovasculares, incluso tras corregir por VAT y BMI [30], sin embargo, los mecanismos subyacentes a esta relación son, por el momento, desconocidos.

3.1.5/ Grasa rodeando al corazón

Se distinguen tres tipos de depósitos rodeando al corazón y las arterias coronarias:

Grasa epicárdica: Se encuentra en el saco pericárdico, principalmente en el canal atrioventricular e interventricular y alrededor del atrio y los ventrículos.

Grasa pericárdica: Localizada entre la superficie externa del pericardio parietal y la cara interna del mediastino.

Grasa pericoronaria: consistente en el tejido adiposo que rodea las arterias coronarias en el epicardio visceral.

Dado que el miocardio y el depósito graso epicárdico comparten la misma irrigación sanguínea y la proximidad anatómica de ambos tejidos, se ha prestado una especial atención a la grasa epicárdica. Se ha demostrado que es metabólicamente activa y es reservorio de varias adipoquinas, lo que indica una potencial comunicación paracrina o vasocrina entre ambos [31]. Pese a existir todavía, en distintos estudios, ciertas discrepancias a la hora de discernir los depósitos epicárdicos y pericárdicos, existen evidencias clínicas que darían una mayor relevancia a la grasa epicárdica frente a la pericárdica en relación a la resistencia a insulina, síndrome metabólico, función cardíaca y aterosclerosis subclínica [32-34].

Las adipoquinas secretadas desde ambos tejidos actuarían localmente, contribuyendo al agravamiento de la inflamación de los vasos coronarios y promoviendo la progresión del ateroma mediante una señalización de fuera hacia dentro de los vasos, reflejando el ambiente de inflamación local más fidedignamente que los niveles plasmáticos de otros biomarcadores de inflamación [35]. Se ha observado que en el depósito graso epicárdico se liberan niveles mayores de citoquinas proinflamatorias como TNF α , IL-6, y MCP-1 así como una mayor infiltración de células inflamatorias que el depósito graso subcutáneo de las extremidades inferiores [35] mientras que a mayor cantidad de este depósito epicárdico, disminuyen los niveles de adiponectina, que tiene efectos de sensibilización a insulina y antiinflamatorios a través de la inhibición de NF κ B y TNF- α [36].

3.1.6/ Grasa perivascolar

Se conoce como el tejido adiposo que rodea los vasos, más allá de las arterias coronarias y el corazón. Se encuentra adyacente a la pared vascular, especialmente en lugares vulnerables al desarrollo de aterosclerosis. Estos depósitos contribuirían a la resistencia a insulina a través de efectos vasculares directos, al reducir la sección transversal de los vasos a su paso por el músculo que resulta en una disminución del flujo sanguíneo en la zona y una menor captación de glucosa. Este mecanismo de vasorregulación por parte de los depósitos grasos que rodean las arteriolas, ha sido propuesto por Yudkin et al. en el modelo de “señalización vasocrina de la grasa perivascolar” [37]. Dado que este depósito libera citoquinas que agravan el proceso inflamatorio e inhiben las rutas de señalización de insulina, estaría contribuyendo a un desajuste en la vasodilatación dependiente del endotelio e induciendo complicaciones vasculares. Además, este acúmulo adiposo, al liberar quimiocinas, estimularía la infiltración de células inmunes al lumen vascular, contribuyendo a la progresión de la aterosclerosis asociada a obesidad [38].

3.1.7/ Grasa rodeando al riñón y en el seno renal

Entre la grasa que rodea al riñón se distingue el depósito pararenal y el epirrenal, quedando separados mediante la fascia renal. Además existe la adiposidad del seno renal, localizada en el interior de la cavidad renal, conteniendo las arterias, venas, vasos linfáticos y nervios. Dichos depósitos producen un efecto local tóxico en la función renal e hipertensión. Se ha descrito que el incremento de grasa en el seno renal se asocia con una mayor presión sanguínea y presión renal intersticial, mediante la compresión de los vasos linfáticos y las venas renales [39]. Así mismo, se ha demostrado que estos lípidos se acumulan en el parénquima renal y tienen efectos dañinos al producir estrés oxidativo, inflamación, fibrosis y lipotoxicidad [40].

3.2/ Depósitos grasos ectópicos

Este tipo de depósitos son normalmente de un tamaño reducido, pero pueden tener efectos mucho más amplios de lo que cabría esperar. Han sido relacionados con

factores de riesgo de enfermedad cardiovascular y obesidad, de forma directa mediante lipotoxicidad o indirecta a través de la secreción de diversas proteínas o citoquinas [39]. Así mismo, los depósitos que revisten el sistema vascular secretan señales vasoactivas [41].

3.2.1/ Grasa en el hígado

La esteatosis hepática no alcohólica, hígado graso NAFLD es la acumulación grasa en el hígado debida a la expresión en el hígado de síndrome metabólico, que tiene múltiples implicaciones sobre factores de riesgo cardiometabólico. Abarca una serie de histopatologías que van desde la simple esteatosis hasta la esteatohepatitis, la fibrosis y la cirrosis. La prevalencia de la DM en la cirrosis hepática es de un 30%, la T2DM puede producir cirrosis, al mismo tiempo que la DM puede ser una complicación de la cirrosis [42], conociéndose esta última como diabetes hepatógena.

Los efectos de este depósito de grasa cursan con un aumento de la insulinoresistencia hepática, donde la insulina no logra detener la producción de glucosa en los hepatocitos, llevando a una hiperglicemia. Otra consecuencia temprana de ella es la inducción de la producción hepática de VLDL mediada por cambios en la ratio de la síntesis y degradación de apolipoproteína B y la lipogénesis *de novo*, así como un mayor flujo de FAs desde el tejido adiposo hacia el hígado [43]. Así mismo, dicha insulinoresistencia hepática induce la liberación de CRP y del PAI-1, ambos marcadores de un estado inflamatorio. Estas anomalías metabólicas, junto con la insulinoresistencia hepática, se ha descrito que directa o indirectamente promueven la aterosclerosis [43]. La hiperglicemia induce una cascada de alteraciones que pasan por la disfunción endotelial, proliferación celular, cambios en la conformación de la matriz extracelular y un desequilibrio en la captación de LDL mediada por receptor. Estas LDL de baja densidad, junto con altos niveles circulantes de VLDL alcanzan una mayor afinidad por los proteoglicanos de la íntima, lo que conduce a una mayor penetración de LDL en la pared arterial [43]. Además, la CRP acelera este proceso al incrementar la expresión de PAI-1 y moléculas de adhesión de células endoteliales, inhibir la producción de óxido nítrico y aumentará la captación de LDL por parte de los macrófagos.

3.2.2/ Grasa intramuscular

Dado que este tejido es la principal diana de provisión de glucosa estimulado por insulina, es considerado un indicador esencial de la insulinoresistencia sistémica. Además, es el destino de la mayor parte de la glucosa ingerida en la dieta, por lo que el contenido lipídico intramuscular –sustrato alternativo y competitivo de la glucosa– sería teóricamente mejor reflejo de la sensibilidad a la insulina del organismo en su conjunto que el contenido lipídico intrahepático, que correlacionará en mayor medida con la sensibilidad a la insulina en el hígado [44]. Por tanto, los desequilibrios en el metabolismo de FAs y TAGs que tienen lugar durante la acumulación de grasa en el músculo esquelético, pueden contribuir al riesgo cardiovascular.

Cuando los FAs se acumulan en un tejido u órgano más allá de lo necesario, el exceso de lípidos es esterificado y almacenado como TAGs en gotas lipídicas, que pueden ser movilizadas por lipasas. Dado que las células no adiposas, y más en concreto las musculares, no tienen la misma capacidad que los adipocitos para almacenar este exceso de FAs en el citosol, cuando esta capacidad es excedida, se genera una lipotoxicidad, que conlleva un desequilibrio metabólico, disfunción, o incluso muerte celular [45]. Esta toxicidad está asociada a moléculas que derivan del metabolismo de los FAs, específicamente del ácido graso saturado palmitato, como el DAG y las ceramidas. Así, se ha observado que individuos sanos con un mayor contenido lipídico intramuscular, ven reducida la autofosforilación del receptor de insulina, así como la cascada de señalización activada por IRS-1 y PI3K [46], como ya se había descrito previamente en ratas con elevados niveles plasmáticos de FAs [47].

Además, en la obesidad y en la T2DM, se producen alteraciones en el metabolismo de FAs en la mitocondria que podrían explicar la asociación entre la acumulación lipídica intramuscular y la insulinoresistencia. Dichos trastornos podrían ser explicados por al menos dos mecanismos. Alteraciones en la vía de oxidación de FAs, especialmente en condiciones postabsorptivas, conducirían a un menor uso de los FAs y a una mayor esterificación y almacenamiento de los mismos en el músculo esquelético. Por el contrario, la pérdida de peso supone una disminución del contenido lipídico intramuscular y podría explicar el aumento de la sensibilidad a la insulina [48]. Esta

situación ocurre también durante el ejercicio, cuando tiene lugar la oxidación de TAGs por parte del músculo esquelético [49].

Sorprendentemente, se ha observado que la concentración de TAGs intramusculares es mayor en deportistas de élite, al mismo tiempo que presentan una alta sensibilidad a insulina [50]. Esta aparente contradicción, conocida como la *“paradoja del atleta”*, todavía carece de una explicación clara, pero se ha propuesto algunos modelos para justificarla. En este fenómeno, la síntesis de TAGs se ve incrementada y la saturación del DAG disminuida. Además, el mayor flujo sanguíneo y la mayor actividad de GLUT4 en el músculo de estos deportistas, factores determinantes de la sensibilidad a insulina, podrían rebasar las implicaciones negativas de la acumulación intramuscular de lípidos sobre el metabolismo de la glucosa mediado por insulina [51]. Por otro lado, la relación entre este acúmulo lipídico y la sensibilidad a insulina en estos atletas podría estar determinada por la mayor capacidad oxidativa de su músculo esquelético [50].

3.2.3/ Grasa en los cardiomiocitos

Como ya se había descrito anteriormente para otros tejidos, la sobreexposición de los cardiomiocitos a una alta carga lipídica induce esteatosis miocárdica, esto causa un desequilibrio entre la captación de FAs y su utilización, lo que lleva a una cardiomiopatía diabética y lipotoxicidad [52,53].

Los cardiomiocitos emplean la β -oxidación de FAs de cadena larga para generar ATP. Durante las primeras fases de la CVD, el metabolismo miocárdico puede pasar de la oxidación de FAs de cadena larga a la de la glucosa, aunque esto pueda ser beneficioso en un principio, puede llevar a la lipotoxicidad y contribuir a la disfunción celular [54]. El acúmulo excesivo de FAs en un tejido no adiposo, implica el acúmulo excesivo de TAGs y dispara el reservorio intracelular de acil-CoA, aumentando su disponibilidad para rutas no oxidativas, entre ésta la síntesis de ceramida [55]. El desajuste en la señalización de la insulina debido a las condiciones de obesidad y diabetes, lleva a una merma de los efectos vasodilatadores y antiinflamatorios de la insulina. En consecuencia, la probabilidad de inflamación vascular y disfunción

endotelial asociada a CVD, aumenta [54]. Así, se ha encontrado niveles dos veces mayores de TAGs en el miocardio de pacientes con T2DM respecto a individuos normales y asociaciones de estos niveles con la resistencia a insulina [56] y deficiencias en la función diastólica ventricular izquierda, de forma independiente de los factores de riesgo convencionales [57].

4/ Señalización de insulina y T2DM

4.1/ Regulación metabólica por insulina: mecanismos

La insulina regula la captación de glucosa y las concentraciones circulantes de FAs (Fig. 2). Así, la insulina:

- En el **músculo esquelético**, principalmente induce la captación de glucosa al promover la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática [58].
- En el **tejido adiposo**, la insulina cumple un efecto antilipolítico, inhibiendo la liberación de FAs desde los adipocitos al disminuir la actividad de la perilipina, lipasas sensibles a hormonas (HSL) y de la adipo-triglicérido-lipasa (ATGL). También inhibe el incremento de la expresión de PGC1 α inducido por β -agonistas, reduciendo el gasto energético [59].
- En el **hígado**, reduce la liberación de glucosa al inhibir la gluconeogénesis hepática y la expresión de enzimas gluconeogénicas clave [60].

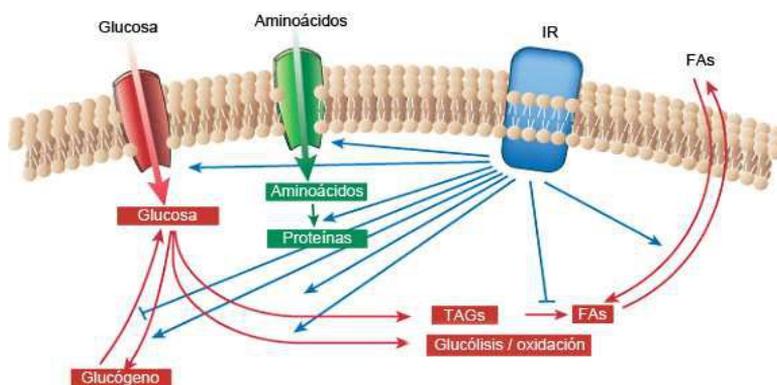


Figura 2. Efectos anabólicos de la insulina. La insulina es la hormona anabólica más potente que se conoce, promueve la síntesis y almacenamiento de carbohidratos, lípidos y proteínas, mientras que inhibe su degradación y liberación a la circulación. Estimula la captación de glucosa, aminoácidos y FAs, e incrementa la expresión o actividad de enzimas clave que catalizan la síntesis del glucógeno, lípidos y

proteínas, mientras que inhibe la actividad o expresión de aquellas que catalizan su degradación. *Adaptado de [61].*

La unión de la insulina a su receptor desencadena complejas cascadas de señalización [61] (Fig. 3), al activar la actividad intrínseca tirosín quinasa de éste, que fosforila residuos Tyr de proteínas diana como los IRS (del IRS-1 al -6), proteínas Sch, Cbl, APS, p60dok y Gab-1, desembocando en tres rutas principales:

- La ruta del **fosfatidilinositol 3-kinasa (PI3K)-Akt** Esta vía es en gran parte responsable de la acción de la insulina sobre la captación de glucosa y la supresión de la gluconeogénesis. La señalización de esta ruta a través de PKB/Akt y PKC- α/ζ , finaliza con la translocación de GLUT4 desde su reservorio intracelular a la membrana plasmática en el músculo esquelético y el tejido adiposo blanco, donde se incrementará la captación de glucosa [60].
- La ruta de las **MAPKs**. Esta vía regula la expresión génica e interactúa adicionalmente con la ruta PI3K-Akt para el control del crecimiento celular y la diferenciación.
- La ruta de **Cbl/CAP**. Esta vía media en el transporte de glucosa a través de la activación de la proteína TC10 que une GTP y el reclutamiento a la membrana del complejo CIP4/Gapex-5 [62].

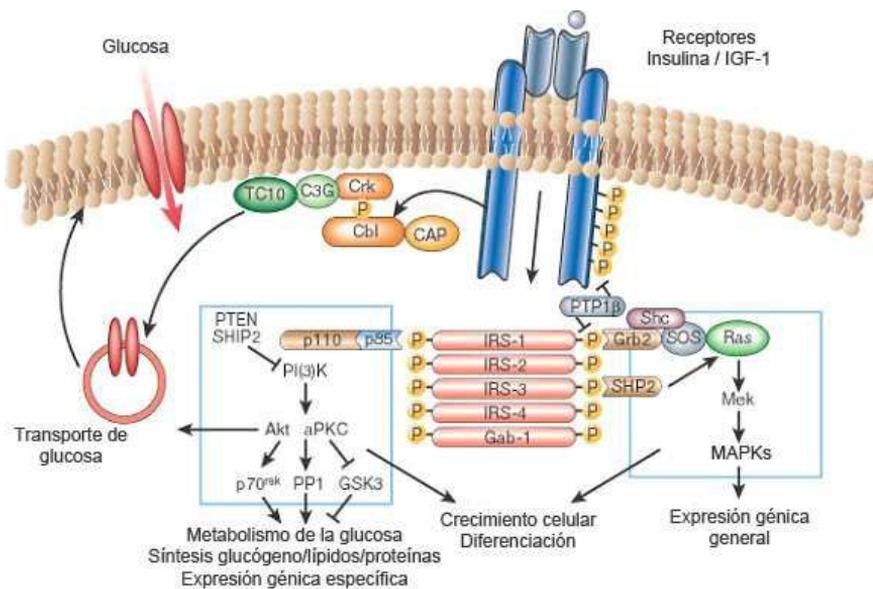


Figura 3. Mecanismo de señalización de la insulina. El receptor de insulina es una tirosina quinasa que se autofosforila y cataliza la fosforilación de proteínas celulares, como son los miembros de la familia IRS, Shc y Cbl. Tras la fosforilación de la tirosina, estas proteínas interactúan con moléculas de señalización a través de sus dominios SH2, resultando en la activación de diversas rutas, incluyendo la PI3K y las quinasas *downstream* dependientes de PIP3, Ras y la cascada de MAPKs, y Cbl/CAP y la activación de TC10. Estas vías actúan de forma concertada para coordinar la regulación de tráfico de vesículas, la síntesis proteica, la activación e inactivación de enzimas, y la expresión génica, lo que resulta en la regulación de los metabolismos de la glucosa, los lípidos y las proteínas. *Adaptado de [61].*

Los principales sustratos del receptor de insulina, las proteínas IRS fosforiladas en Tyr, funcionan propagando la señalización de la insulina al unir proteínas que contienen el dominio SH2, como la subunidad reguladora p85 de PI3K, Nck, Fyn, Grb-2 y SHP2 (Fig. 3). El efector PI3K, uno de los más conocidos cataliza la formación de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato, que induce la actividad de PDK-1 e inicia la activación *downstream* de PKB/Akt, la diana de rapamicina en células de mamífero mTOR, la quinasa p70 S6 (S6K1) así como las isoformas atípicas de PKC (PKC ζ / λ) [63].

Se ha propuesto que IRS-1 e IRS-2, pese a ser ambos ubicuos, no son funcionalmente intercambiables en tejidos responsables de la producción de glucosa –hígado-, su captación –músculo esquelético y tejido adiposo- da producción de insulina -células β pancreáticas-. IRS-1 parece cumplir su función principal en músculo esquelético e IRS-2 regular la acción hepática de la insulina así como el desarrollo y la supervivencia de las células β [64]. Por otro lado, los IRS-3 y -4 podrían jugar un papel redundante en la señalización de IRSs, mediando en la actividad de PI3K en adipocitos participando en la translocación de GLUT4 [65], o bien actuar comoreguladores negativos de la señalización de IGF-1 al inhibir la acción de otros IRS [66].

El IRS-1 es un elemento crítico cuyas mutaciones ha mostrado guardar relación con la susceptibilidad a desarrollar T2DM. En células normales, el IRS-1 es el principal sustrato para la unión y la activación de la PI3K mientras que el IRS-2 es también funcional pero requiere de una mayor concentración de insulina para la misma actividad. Se han observado niveles de expresión de IRS-1 más bajos en los adipocitos de individuos obesos no diabéticos, así como en el músculo esquelético de los insulinoresistentes [67], donde IRS-2 se torna el principal sustrato del IR [68].

4.2/ Resistencia a la insulina: mecanismos

La resistencia a insulina se define como la inadecuada respuesta de sus tejidos diana, como son el músculo, el hígado y el adiposo, a los niveles fisiológicos de la hormona circulante. Este desajuste en la sensibilidad a insulina, cursa con la disminución de la captación de glucosa por parte del músculo esquelético, y con una menor capacidad de inhibición de la gluconeogénesis hepática y la lipólisis en el tejido adiposo [60]. Así se induce un aumento en los niveles circulantes de FAs y la acumulación ectópica de grasa, que contribuye adicionalmente a impedir la captación de glucosa mediada por insulina en el músculo esquelético [58]. La resistencia a insulina es un predictivo principal de varias secuelas metabólicas incluyendo la T2DM, y es una característica definitoria del llamado síndrome X o síndrome metabólico. Así mismo, el riesgo de T2DM, asociado con los factores del síndrome metabólico –como son la obesidad abdominal, trastorno de metabolismo de la glucosa, dislipidemia e hipertensión– aumenta con la edad [69], pudiendo atribuirse en parte este aumento a la prevalencia del sobrepeso y la obesidad en las personas de edad avanzada.

Los estudios en humanos y ratones indican que la T2DM es una enfermedad poligénica que implica una resistencia periférica a la insulina y un desajuste en la secreción de insulina por parte de las células β pancreáticas [70]. Mediante estudios génicos de knockout en ratones, se ha demostrado que el IR, los IRS, el GLUT4, los PPARs, la fosforilación oxidativa y la proteína dañina al retinol, juegan papeles clave en el desarrollo de la resistencia a insulina y pueden modificar dramáticamente la expresión fenotípica de la enfermedad [9]. Por supuesto, factores ambientales como la dieta y el gasto energético también tienen efectos importantes, indicando que el incremento en la adiposidad interacciona fisiológicamente de algún modo con los parámetros genéticos que controlan la sensibilidad a insulina.

Uno de los principales mecanismos por los que la señalización de insulina es regulada negativamente es mediante la fosforilación de ciertos residuos Ser del IRS-1, como son la Ser312, la Ser636 o la Ser1101 [71], según se observó al estudiar las

alteraciones mediadas por $TNF\alpha$ en la acción de la insulina (Fig. 4). Se han descrito, sin embargo, fosforilaciones en otros residuos Ser de IRS-1 que estarían activando positivamente la señalización de insulina. Las fosforilaciones inhibitorias impiden la asociación normal de IRS-1 con el IR, produciendo un desacoplamiento en la cascada de señalización. Posteriormente se han descrito una serie de factores, entre ellos, nutrientes como FAs (Fig. 4) y aminoácidos, que también inducen insulinoresistencia, al menos en parte, mediante la fosforilación inhibitoria en Ser del IRS-1 [71]. Aunque los mecanismos concretos de inhibición todavía deben ser dilucidados, es aparente que varias serínquinasas están implicadas, como son la quinasa κB (IKK), JNK, mTOR y PKC- θ [71]. Dos de ellas, IKK y JNK son además componentes integrales de dos rutas proinflamatorias principales, lo que indicaría un nexo entre inflamación y resistencia a insulina [72]. Esto queda patente al haberse observado que numerosos estados de resistencia a insulina están asociados a una mayor activación de JNK y/o IKK, junto a una fosforilación inhibitoria de Ser de IRS-1. Por el contrario, la inhibición o inactivación de JNK o IKK mejora la sensibilidad a insulina en distintos modelos de insulinoresistencia en asociación con una reducida fosforilación inhibitoria de IRS-1 [73].

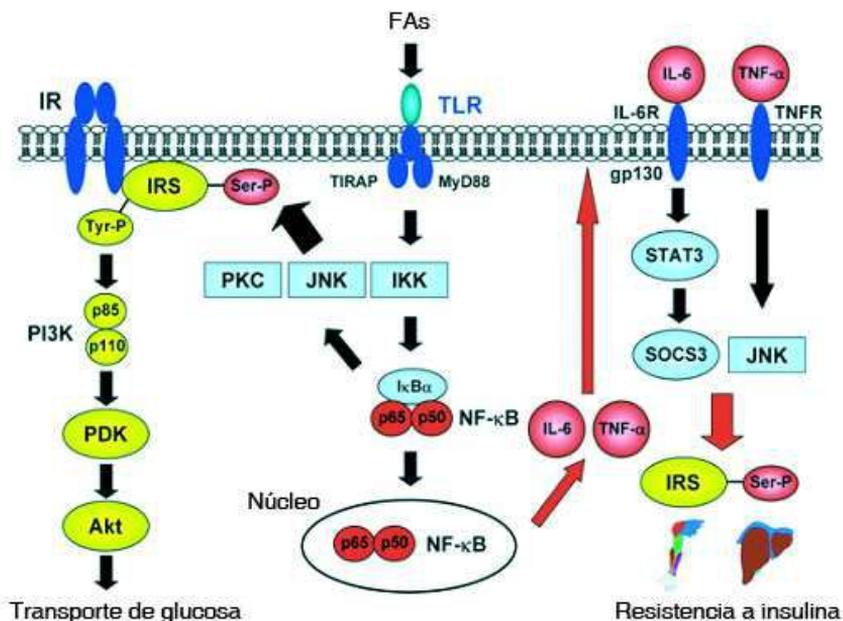


Figura 4. NF- κB media la inflamación asociada a obesidad y la resistencia a insulina. Los FAs se unen a los TLRs para activar las quinasas de κB (IKKs), que causan la degradación de $I\kappa B\alpha$ y estimulan la translocación nuclear y la expresión de los genes asociados a NF- κB (IL-6 y TNF- α). IKK, JNK y PKC activadas promueven una fosforilación en serina de los IRSs, lo que atenúa la señalización de insulina dependiente de la fosforilación en tirosina de los IRSs, de PI3K, PDK y Akt, resultando en un transporte

reducido de glucosa a las células (resistencia a insulina). La activación de NFκB promueve la producción local de citoquinas proinflamatorias (IL-6 y TNFα) que reducen la señalización de insulina mediante la proteína supresora de la señalización por citoquinas 3 (SOCS3) y JNK, causando resistencia a insulina. *Adaptado de [74].*

Además de las citadas serin-quinasas de IRS, existen otros mediadores importantes que enlazan la señalización de citoquinas con la insulinoresistencia, como son los supresores de señalización de citoquinas SOCS1 y SOCS3 –inducidas en inflamación por IL-6 (Fig. 4), entre otros factores, y que inducen la ubiquitinación y degradación de IRSs-, así como el óxido nítrico (NO) –molécula de señalización endógena producida por la óxido nítrico sintasa (iNOS)-. La actividad de iNOS es inducible por diversas citoquinas inflamatorias y el NO promueve la ubiquitinación y degradación vía proteasoma del IRS1, reduciendo la actividad de AKT principal mediador en la señalización de IRS [58].

5/ Resistencia a insulina en la obesidad

5.1/ Resistencia a insulina inducida por lípidos. Papel del músculo esquelético

La obesidad y el incremento asociado de masa grasa en el cuerpo son el resultado de un balance energético positivo crónico y de largo plazo (meses o años), por lo que sus mecanismos subyacentes de insulinoresistencia difieren del balance energético positivo agudo (de corto plazo). Al ser resultado de un exceso de nutrientes mantenido en el tiempo, se manifiesta mediante mecanismos complejos y heterogéneos que pueden diferir entre pacientes, y en última instancia distintas causas pueden propiciar la insulinoresistencia. De hecho, cuando emulamos este flujo incrementado de una mayor ingesta y catabolismo de FAs en individuos obesos (mediante infusión de heparina y lípidos) aumentamos su resistencia a insulina [75]. En el músculo esquelético en obesidad se observa una oxidación incompleta de grasas, pese a una sobreexpresión de los genes implicados en su oxidación, acompañada de una mayor captación de FAs, lo que resulta en una acumulación incrementada de IMTG [76], cuyos niveles, en sujetos sedentarios, correlaciona directamente con la resistencia a insulina [77].

Se han propuesto dos mecanismos mediante los que el exceso de adiposidad podría antagonizar el efecto de la insulina en los tejidos periféricos: cuando los adipocitos

exceden su capacidad de almacenamiento, la grasa comienza a acumularse en tejidos no especializados, llevando a la producción de metabolitos que inhiben la transducción de señal de la insulina, como el DAG o la ceramida [78,79]. Otro mecanismo sería que la obesidad activa un estado inflamatorio crónico, donde las citoquinas liberadas por los adipocitos y macrófagos infiltrados serían las que antagonizarían el efecto de la insulina. De dicha resistencia derivan, además de dos defectos metabólicos, un elevado estrés oxidativo y del retículo endoplasmático, la inflamación crónica de bajo grado y una proteólisis incrementada [80].

Cuando los FAs son captados por el músculo o el hígado, pueden tomar dos rutas, bien la β -oxidación en la mitocondria o bien el almacenamiento como TGs. En el caso del hígado, estos TGs pueden pasar a formar parte del depósito intracelular del hepatocito o de las VLDL, que posteriormente serán liberadas a la circulación sistémica [81]. El paso limitante en la entrada y β -oxidación de FA de cadena larga es su transporte a la mitocondria mediante las CPTs. La carnitina palmitoiltransferasa I (CPT-1), cuya actividad depende en primera instancia de los niveles de malonil-CoA, actúa como un sensor energético, más en músculo que en hígado. Dichos niveles son controlados por la actividad relativa de la ACC2 y la malonil-CoA decarboxilasa, ambas reguladas a su vez por AMPK. No obstante, otras proteínas podrían ser limitantes como la carnitina-acilcarnitina translocasa (CACT) o la proteína transportadora de ácidos grasos 1 (FATP) [82].

La síntesis de TAGs a partir de FA supone la adición secuencial de FAs activados como acil-CoAs a un esqueleto de glicerol. En este proceso participa la glicerol-3-fosfato aciltransferasa que sintetiza el ácido lisofosfatídico, que es luego convertido a ácido fosfatídico y éste a DAG. Finalmente, la DAG aciltransferasa añade los acil-CoA al DAG.

En el músculo, los DAGs acumulados pueden causar resistencia a insulina. En condiciones normales, ésta se une a IR, dándose la fosforilación de Tyr del IRS-1, activando PI3K, regulador clave de la translocación de GLUT4. En presencia de altos niveles de FAs, una alta concentración de DAG activa la serín-quinasa PKC θ , produciéndose la fosforilación de IRS-1, que no podrá reclutar PI-3, inhibiéndose la

translocación. En el citosol, también se ha propuesto que los FAs inhiben directamente la actividad de la hexoquinasa, la glucógeno sintasa y la piruvato deshidrogenasa. Se ha hipotetizado que cuando el músculo aumenta la utilización de FAs, especialmente saturados de cadena larga, estos intermediarios como el DAG se acumulan, si no sintetiza adecuadamente TAGs o se oxidan los FAs, desensibilizando a la acción de la insulina [79]. Como se mencionó anteriormente, la "paradoja del atleta" podría ser explicada por la mayor capacidad de síntesis de TGs en músculo, que conlleva una menor acumulación de los metabolitos intermediarios que producen insulinoresistencia. Esta hipótesis es apoyada por los hallazgos de que una mayor capacidad de incorporación de FAs a TGs en el hígado o el tejido adiposo no produce resistencia a insulina, si no que además podría prevenir la inducida por la dieta [83-85].

Otro producto importante en el metabolismo de FAs es la ceramida, sintetizada cuando existe una alta disponibilidad de FAs, especialmente de 15-17 carbonos. El esfingolípido ceramida es un intermediario putativo que conecta el exceso de nutrientes y las citoquinas inflamatorias con la inducción de la resistencia a insulina [86]. No en vano, la ceramida resulta tóxica para diversos tipos celulares y se la ha asociado a daños celulares que acompañan a la diabetes, hipertensión, fallo cardíaco, aterosclerosis, etc. La ratio de síntesis de ceramida depende en gran parte de la disponibilidad de grasas saturadas de cadena larga que participan en el paso inicial y limitante de en la síntesis de novo de ceramida. En dicha reacción la SPT/serinpalmitoiltransferasa cataliza la condensación de palmitoil-CoA y serina para producir 3-oxoesfingina [87]. A partir de ésta se sintetiza esfingina, dihidroceramida y finalmente ceramida, precursora de los esfingolípidos complejos. Dada la dependencia de grasas saturadas para la síntesis de ceramida, se la ha considerado una importante candidata en la relación de la sobrecarga lipídica y la insulinoresistencia. La ceramida puede inhibir Akt/PKB. Además, se ha sugerido que ciertos estímulos extracelulares -como FAs exógenos, citoquinas como IL-1, estímulos de estrés como la radiación UV, etc- podrían también regular la ratio de síntesis de novo de ceramida sin afectar a los niveles de palmitoil-CoA, sobrepresando la serinpalmitoiltransferasa.

En suma, las grasas saturadas son metabolizadas menos eficientemente que las insaturadas, lo que las hace más susceptibles de acumularse en tejidos resistentes a insulina; son los lípidos más fuertemente correlacionados en sucesivos estudios epidemiológicos con la resistencia humana a la insulina; y en los que se ha encontrado una mayor capacidad inhibitoria sobre la sensibilidad a insulina tanto *in vivo* como *in vitro*.

Por otra parte, los FAs, en particular los saturados, activan células tipo macrófago mediante el receptor tipo Toll (TLR) de lipopolisacáridos (LPS) TLR4 (Fig. 4). Las elevadas concentraciones de FAs en obesidad pueden inducir inflamación directamente en macrófagos y adipocitos al activar NF- κ B y la producción de citoquinas. En modelos murinos que carecen de TLR4 esta ruta proinflamatoria se ve truncada y estos individuos se ven protegidos a la resistencia a insulina inducida por la dieta [88]. Pero además de esta activación directa de los FAs, la HFD hace aumentar los niveles circulantes de LPS, potente activador de TLR4 junto con el CD14 soluble, que también une LPS. CD14 puede encontrarse en la membrana o bien en forma soluble, uniendo LPS y presentándolo a otros tipos celulares que no tienen TLR4. Dicho LPS procede del intestino, donde es producido por bacterias Gram negativas y entra en la circulación a través de los quilomicrones. Debido a ser transportado por éstos, la dieta alta en grasas estimula su absorción, aumentando la endotoxemia [89,90]. Se ha observado que esta endotoxemia no sólo resulta en una inflamación del TGA, mayor glicemia en ayunas e insulinemia debido a la insulinoresistencia hepática, si no también induce la ganancia directa de peso [9]. Esto indica que la endotoxemia inducida por la HFD puede disparar la resistencia a insulina, incluyendo la obesidad y la inflamación crónica, pudiendo ser especialmente relevante en individuos de edad avanzada, dado que en modelos murinos se ha observado que con la edad aumenta la respuesta inflamatoria a la endotoxemia [91].

Por otro lado, los lípidos intracelulares como los xiesteroles o los FAs, pueden actuar como mediadores antiinflamatorios al ser ligandos de LXR y las familias PPAR de receptores nucleares, respectivamente. La activación de estos factores de transcripción inhibe la expresión de genes inflamatorios en macrófagos y adipocitos, en gran parte mediante la supresión de NF κ B [92].

Por último, la acción de estos ligandos lipídicos está influenciada por las FABPs citosólicas, habiéndose observado que la ausencia de las FABPs ap2 y mal1 ofrece una fuerte protección frente a la T2DM y la aterosclerosis en ratones [93]. Por lo tanto, la localización corporal, la composición del ambiente celular y la unión a rutas de señalización diana parecen ser factores clave a la hora de determinar si los lípidos promueven o suprimen la inflamación y la resistencia a insulina [92].

5.1.1/ Pasos limitantes en la captación mitocondria y la oxidación de ácidos grasos. FATP1

La captación celular de FAs de cadena larga se puede llevar a cabo mediante difusión pasiva “flip-flop”, o bien a través de proteínas. Si bien varios estudios experimentales apoyan ambas posibilidades, actualmente se cree que las evidencias indican un sistema predominante de captación de FAs mediado por proteínas en los tejidos metabólicamente importantes [94]. Se ha identificado una serie de transportadores, incluyendo CD36, FABP_{pm} (FABP asociados a la membrana plasmática) y la familia de transportadores de FAs (FATP1-6). Además, la FABP_c (FABP citoplasmática) se encuentra presente en abundancia en el citoplasma soluble, donde también podría encontrarse dirigiendo el metabolismo de FAs [94].

Una de las familias implicadas es la familia FATP, con 6 miembros identificados en mamíferos [95]. Uno de sus miembros es FATP1, proteína integral de membrana con un dominio transmembrana en el extremo amino terminal y con actividad acil-CoA sintetasa intrínseca, si bien menor respecto a otra CoA ligasas. FATP1 se expresa principalmente en músculo esquelético, corazón y tejido adiposo [96]. Se le ha localizado en la membrana plasmática de adipocitos 3T3-L1 diferenciados [96] o estimulados por insulina [97], y células 293 [98]. Sin embargo, ha sido consistentemente encontrado en compartimentos intracelulares en adipocitos y células musculares en cultivo: en adipocitos 3T3-L1 no estimulados, en un compartimento perinuclear solapando un marcador de Golgi [97], así como en mitocondria [99]; en otro estudio en el retículo endoplasmático, pero no en mitocondria [100]. Nuestro grupo previamente ha encontrado que FATP1 no está presente en la membrana

plasmática de células musculares, si no perinuclearmente siguiendo un patrón reticular y parcialmente solapando un marcador de Golgi [101]. Posteriormente lo localizamos en las fracciones enriquecidas en mitocondrias de células musculares C2C12 cultivadas [102] y se colocalizó a la proteína de fusión FATP1-GFP con marcadores mitocondriales tanto en células musculares tanto C2C12 [102] como L6E9 [82]. También se ha descrito su presencia intracelular en una población no definida de vesículas en músculo soleus aislado [103], así como en los túbulos T y fracciones de sarcolema en músculo de las extremidades inferiores en rata [104]. Sin embargo, no se han obtenido evidencias de la localización del FATP1 transfectado en membranas mitocondriales de músculo esquelético maduro de ratón [94].

A nivel funcional, FATP1 es capaz de incrementar la captación de FAs en músculo [101,105], aunque en función de su localización subcelular se discute si es debido a su movimiento transmembrana o a alguna fuerza conductora asociada a su actividad acil-CoA sintetasa, la cual podría atrapar los FAs entrantes como acil-CoAs [100,106] y dirigir su metabolismo. De hecho, nuestros estudios en músculo esquelético cultivado muestran que FATP1 dirige los FAs hacia la síntesis de TAG [8,101], mientras la oxidación de FAs es moderadamente estimulada [82], o débilmente reducida [101]. En cambio, otros estudios [105] concluyeron que FATP1, expresado en músculo, no promueve la acumulación intramuscular de TAGs en ratones ni la resistencia a insulina sistémica si no que aumentaba la oxidación de FAs. Por otra parte, FATP1 es capaz de incrementar fuertemente la oxidación de glucosa y activar el complejo PDH en células musculares cultivadas [102]. Su ablación genética en ratones no varía la captación basal de FAs pero reduce su estimulación por insulina en tiras musculares aisladas, y retrasa la retirada de FAs del suero estimulada por insulina [103]. Sin embargo, su delección en ratones protege de la acumulación de acil-CoA y resistencia a insulina inducida por lípidos en músculo esquelético [107]; así como de la reducción del *turnover* sistémico de la glucosa estimulado por insulina [107], del desajuste en la tolerancia a insulina y de signos del síndrome metabólico [103]. Por todo ello, FATP1 es considerado una diana terapéutica a inhibir para la resistencia a insulina [108].

5.2/ Inflamación inducida por estrés del retículo endoplasmático

Un desencadenante potencial de la inflamación inducida por obesidad es el estrés del retículo endoplasmático (ER). La acumulación excesiva de lípidos, ocasiona estrés en el ER del hígado, tejido adiposo, músculo esquelético y célula β pancreática, activando una respuesta en una ruta de señalización conocida como “respuesta a proteínas desplegadas” (UPR), que conlleva reacciones protectoras, pero también inflamatorias y apoptóticas [109]. En los mamíferos, hay tres clases de sensores de estrés ER: el enzima IRE1 (α y β); la proteína quinasa PERK; y el factor de transcripción ATF6 [110].

La quinasa / endorribonucleasa IRE1 desencadena el *splicing* no dependiente del spliceosoma del ARNm para el factor de transcripción XBP-1 que controla las respuestas protectoras al estrés del ER. Así mismo, IRE1 también induce una cascada de señalización inflamatoria al activar IKK, las MAPKs p38 y JNK, y finalmente NF κ B. Por último, este estrés del ER inducido por la obesidad lleva a la fosforilación en Ser de IRS, inhibiendo la señalización de insulina. En este sentido, se ha observado que en modelos murinos heterocigotos para XBP-1^{+/-} dichas respuestas protectoras se ven atenuadas [109] y resultan propensos a la resistencia a insulina, mientras que la administración de chaperonas reduce el estrés del ER, recuperándose la sensibilidad a insulina [111]. Por último, dicho estrés reduce la expresión de GLUT4 en los adipocitos [112].

La activación de PERK atenúa la síntesis general de proteínas a través de la fosforilación del factor de iniciación eucariota de la traducción 2α , que pone en marcha la expresión de genes implicados en respuestas antioxidantes, el metabolismo de aminoácidos, la autofagia y la apoptosis [110].

ATF6 es un factor de transcripción tipo bZIP, que se localiza anclado a la membrana del ER en condiciones normales. En condiciones de estrés del RE, cuando se acumulan proteínas mal plegadas en el lumen, se trasloca al aparato de Golgi donde es procesado a su forma activa mediante proteólisis liberando su dominio citosólico,

que controlará la sobreexpresión de genes concretos implicados en la UPR [110], destinada a aumentar la capacidad de plegamiento de ER.

Sin embargo, la lipotoxicidad como factor inductor de un estrés del ER crónico, podría diferir del estrés del ER clásico no sólo en la forma de ser inducido (por acumulación de proteínas en el lumen, en vez de un mal plegamiento de las mismas [113]), si no por la capacidad de los FAs de impactar en las distintas vías. Así, se ha visto que los FAs saturados interrumpen el tráfico de proteínas entre el ER y el aparato de Golgi [114].

5.3/ Mediadores en inflamación

5.3.1/ Citoquinas y quimiocinas

Las citoquinas son moléculas secretables de bajo peso molecular, generalmente de menos de 30 KDa, cuya expresión se encuentra altamente regulada. Al ser descubiertas en linfocitos, originariamente se las denominó linfocinas. Posteriormente, al observarse que muchos otros tipos celulares las secretaban, pasaron a denominarse en general citoquinas, y en particular interleuquinas, a aquellas implicadas en la comunicación entre leucocitos. Su expresión constitutiva es en general despreciable, siendo necesaria la activación de la célula para producirlas a niveles funcionales. Suelen actuar a muy bajas concentraciones. Normalmente son glicosiladas para aumentar su estabilidad y solubilidad, aunque algunas de ellas permanecen ancladas a la membrana o a la matriz extracelular. Pueden cumplir efectos auto-, para- y algunos casos endocrinos uniéndose a receptores de alta afinidad. Se caracterizan por un amplio pleiotropismo y redundancia, esto es, una misma citoquina cumple distintos efectos a través de distintos receptores, y varias citoquinas pueden cumplir funciones solapadas sobre un mismo tipo celular. Funcionalmente podemos dividir las citoquinas implicadas en el desarrollo hematopoyético (IL-3, IL-5, IL-7, IL-9, IL-11, GM-CSF, G-CSF y M-CSF), implicadas en la inmunidad innata (IL-1, IL-6, TNF, IL-10, IL-12 y IL-18) e implicadas en la inmunidad adaptativa (IL-2, IL-15, IFN, IL-4, IL-13, IL-16 y TGF). Respecto a si promueven o atenúan el proceso inflamatorio, podemos distinguir las inmunosupresoras (inhiben el

crecimiento celular y/o la secreción de otras citoquinas: IL-4, IL-13, IL-10, TGF β , INF α y IFN β) y las proinflamatorias (IL-1, IL-6, TNF α y IFN γ).

Las quimiocinas son un conjunto de citoquinas con funciones quimioatrayentes que promueven la migración de leucocitos hacia órganos diana, que a diferencia de otras citoquinas tienden a unirse a proteoglicanos y proteínas de la matriz para immobilizarse y no pasar a la circulación, actuando como un rastro que los leucocitos pueden seguir. Estructuralmente, en función de la conservación de 4 residuos Cys implicados en 2 puentes disulfuro característicos, se distinguen las quimiocinas CXC (Cys-S-Cys) y las CC (Cys-Cys), según si están separadas las cisteínas por otro residuo o no. En general las primeras son potentes quimioatrayentes de neutrófilos (ej. IL-8 o CXCL8) y las segundas preferentemente de monocitos (MCP-1) y células T (RANTES o CCL5). En la actualidad también se está tratando de clasificarlas entre quimiocinas inflamatorias (o clásicas, atrayentes de monocitos y neutrófilos) e inmunoquimiocinas (atrayentes de linfocitos). Dado que la respuesta inflamatoria se inicia con la migración de estas células al foco inflamatorio, las quimiocinas son inducidas por diversos factores proinflamatorios (IL-1, TNF, IFN γ , LPS).

5.3.2/ Resistencia a insulina inducida por inflamación

En la actualidad se sabe que el tejido adiposo produce grandes cantidades de adipocinas como TNF α , IL-1 β , IL-6, y MCP-1 y es un responsable principal de los elevados niveles sistémicos de TNF α en obesidad (Fig. 5). Modelos murinos muestran que también la edad contribuye a un mayor estado inflamatorio en el tejido adiposo. Sorprendentemente, la inflamación crónica del VAT reducida por obesidad, cuando éste es transplantado de un donante obeso a un receptor delgado, puede trasladar este estado de inflamación sistémica y enfermedad vascular [115].

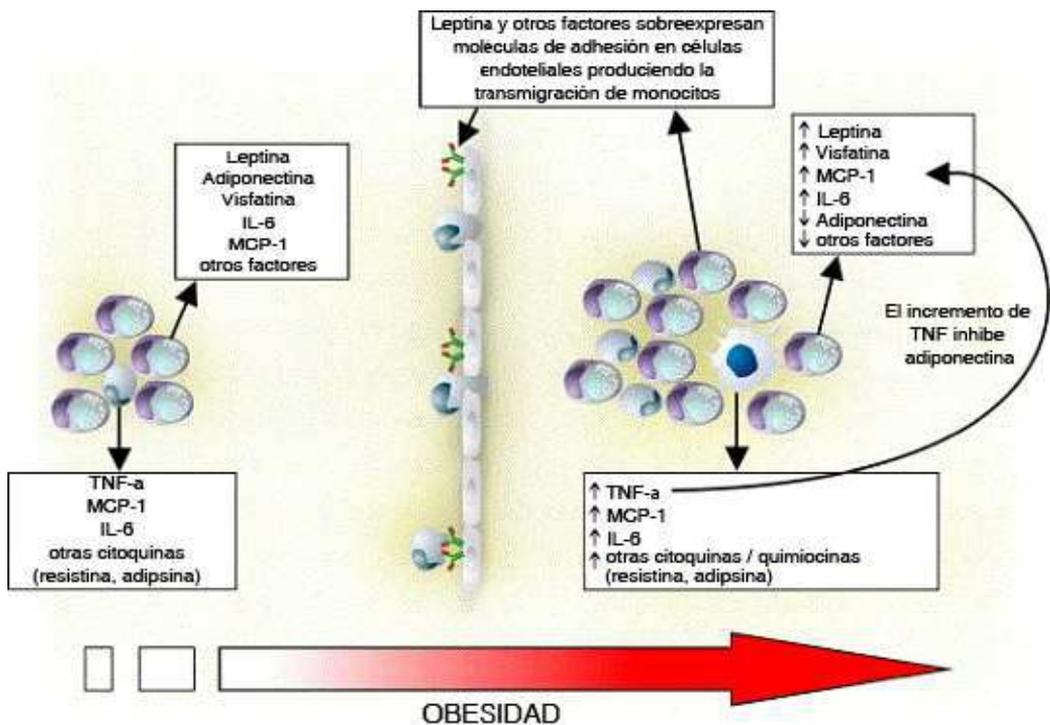


Figura 5. El tejido adiposo: componentes celulares y molécula producidas. El tejido adiposo se compone de la fracción adipocitaria y la fracción estromovascular, que incluye macrófagos. Izquierda: los adipocitos producen leptina, adiponectina, visfatina, IL-6, MCP-1, y otros factores. Los macrófagos producen TNF- α , IL-6, MCP-1 y otras citoquinas y quimiocinas. En humanos, la fuente celular principal de adiponectina y resistina parece ser el macrófago. Derecha; en obesidad la leptina y posiblemente otros factores producidos por los adipocitos, macrófagos, o ambos, inducen la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales, lo que lleva a la trans migración de monocitos derivados de la médula ósea y así a un aumento en los macrófagos residentes en el WAT (ATMs), algunos de los cuales se fusionan para generar células gigantes multinucleadas. Los ATMs de individuos obesos producen mayores niveles de TNF α , IL-6 y quimiocinas en comparación con los de delgados. Al mismo tiempo, la producción adipocitaria de adiponectina se reduce, posiblemente por los niveles locales incrementados de TNF α . *Adaptado de [116].*

La inflamación es un componente en la resistencia insulina asociada a la obesidad. Se ha demostrado, tanto en modelos animales como en humanos, que la inhibición genética o farmacológica de las rutas de respuesta inflamatoria protege frente a la resistencia a insulina inducida por la dieta [92].

Existen muchas evidencias de que la activación crónica de rutas proinflamatorias intracelulares en células diana para la insulina llevan a la resistencia a insulina asociada a la obesidad, en la que tanto adipocitos como macrófagos pueden liberar citoquinas y quimiocinas como son CCL2, IL-6, IL- β , factor inhibitorio de migración de macrófagos (MIF) o TNF α [117]. En este sentido, se han encontrado mayores niveles

circulantes de $\text{TNF-}\alpha$ y IL-6 en individuos con resistencia a insulina y diabetes [118], una mayor producción de $\text{TNF-}\alpha$ en el músculo y adiposo de humanos obesos [119] [120], así como mayores niveles de $\text{TNF-}\alpha$ en el tejido adiposo de ratones obesos que, al ser neutralizados, revirtieron en una mejor sensibilidad a insulina [121]. De la misma forma, en los últimos años se han ido identificando muchos otros mediadores de inflamación que estarían interfiriendo en la acción de la insulina en la obesidad, encontrándose entre los genes más fuertemente regulados en animales obesos.

El $\text{TNF-}\alpha$, además de activar vías de resistencia a insulina como $\text{IKK-}\beta$ y SOCS3 , podría alterar la expresión de genes para el IR como IRS1 , GLUT4 , adiponectina y $\text{PPAR}\gamma$ [58]. Del mismo modo, otras citoquinas inflamatorias interfieren en la vía de señalización de la insulina: IL- β provoca la fosforilación de Ser en IRS1 al activar ERK [122] e IL-6 bloquea la señalización de IRS mediada por insulina en músculo e hígado a través de las proteínas SOCS [123]. Sin embargo, el papel de IL-6 en obesidad resulta controvertido ya que, mientras altos niveles circulantes crónicos han mostrado desajustes en la captación de glucosa por parte del músculo, su sobreexpresión promueve la pérdida de peso y en determinadas condiciones, altos niveles sistémicos de IL-6 han mostrado incluso mejorar la sensibilidad a insulina [58].

Por el contrario, mediadores antiinflamatorios como la IL-10 o la adiponectina ejercen un papel de sensibilización a la insulina. Se ha demostrado que la inhibición temporal de la IL-10 endógena, en modelos animales con una transducción deficiente de la señal de insulina y esteatosis, desajusta la sensibilidad a insulina en el hígado, revelando un papel protector de la IL-10 en la insulinoresistencia hepática asociada a la esteatosis inducida por la dieta [124]. Al mismo tiempo, ciertas quimiocinas como MCP-1 e IL-8 afectarían indirectamente a la sensibilidad a insulina atrayendo macrófagos hacia el tejido adiposo que, una vez infiltrados en el tejido y activados por los altos niveles de $\text{TNF-}\alpha$, serían las principales fuentes de factores inflamatorios [58]. La leptina, aumentada en obesidad, también induce la producción de MCP-1. Este reclutamiento y activación de macrófagos, fuente y diana de mediadores inflamatorios, desencadenaría el círculo vicioso de inflamación mantenida y resistencia a insulina [58]. Mientras que el bloqueo de la señalización de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ mediante la

deleción específica de IKK β en el hígado, sólo mejora la sensibilidad en el hígado, su deleción en el linaje mieloide reduce la insulinoresistencia sistémica [125].

En resumen, parece claro que la obesidad propicia un estado de inflamación crónica de bajo grado y resistencia a insulina, sin embargo la perfusión de citoquinas inflamatorias o lípidos en animales no obesos produce insulinoresistencia, y muchas condiciones de inflamación crónica en humanos no obesos suponen un alto riesgo de diabetes y riesgo cardiovascular. Además, la eliminación directa o farmacológica de los mediadores o señales inflamatorias, mejora la sensibilidad a insulina. Por lo tanto, las evidencias documentadas hasta la fecha, sugerían entonces que la T2DM es una enfermedad relacionada con la inflamación y es la causa primaria de la resistencia a insulina asociada a la obesidad, la hiperglicemia y la hiperlipidemia, más que la mera consecuencia de éstas [92].

La hipoxia del tejido adiposo en obesidad se considera un factor desencadenante de la inflamación. Parece razonable pues, que los encargados de activar la respuesta inflamatoria, al ser las primeras células afectadas en el transcurso de la obesidad, sean los adipocitos o las células adyacentes afectadas por el crecimiento de éstos. Dado que el depósito adiposo se expande, los adipocitos crecientes resultan hipoperfundidos creándose ambientes de microhipoxia en determinadas áreas, donde aumenta la expresión de HIF-1 [126]. La hipoxia estabiliza la proteína HIF-1 α , que en condiciones de normoxia sería rápidamente ubiquitinada y degradada en el proteasoma [127]. Esta estabilización y acumulación de HIF-1 α induce la expresión de una serie de citoquinas relacionadas con la inflamación, así como de GLUT1 [128], lo que podría reflejar una adaptación del metabolismo de la glucosa a las condiciones hipóxicas, estimulando la glucólisis de cara a una caída en el metabolismo aerobio. El tejido adiposo hipóxico comienza a activar entonces las vías de JNK1 y IKK/NF κ B, la expresión de genes proinflamatorios y de estrés del retículo endoplasmático [126]. La activación de estas vías lleva a la liberación de quimiocinas y el consiguiente reclutamiento de macrófagos hacia el tejido adiposo donde forman estructuras anilladas en torno a los adipocitos saturados moribundos, con el fin de eliminar restos celulares y promover el remodelado tisular. Pero a su vez también liberan más citoquinas proinflamatorias que inducen insulinoresistencia en los adipocitos

adyacentes por vía paracrina, siendo además posible que los nuevos macrófagos reclutados, mediados por el ambiente hipóxico en el tejido adiposo, continúen exacerbando el estado inflamatorio [60]. Estos mecanismos parecen ser más acentuados en el VAT que en el SAT, dado que la expansión de la grasa visceral parece tener únicamente un efecto negativo sobre la sensibilidad a insulina [129].

De esta forma, tanto en el SAT como el VAT de individuos obesos, se observan estructuras “tipo corona”, en las que los macrófagos rodean a los adipocitos hipertrofiados y necróticos, para reabsorber los restos celulares y las gotas lipídicas liberadas [130]. Se cree que en este proceso quimiotáctico estarían implicadas las quimiocinas liberadas por los adipocitos a causa de estrés del RE y la hipoxia. Así, se ha encontrado que en individuos obesos *Mcp-1*, *Mcp-2*, *Mcp-3*, *RANTES*, *MIP-1 α* y *CCL11* se encuentran sobreexpresados en el tejido adiposo, así como los receptores de quimiocinas *CCR1*, *CCR2*, *CCR3*, y *CCR5* [131]. Además, *CCR2* y *CCR5*, en mayor medida en el VAT que en el SAT.

A pesar de que adipocitos, preadipocitos, células endoteliales vasculares, linfocitos T y células mesoteliales contribuyen a la secreción de mediadores proinflamatorios, la principal fuente de éstos en el tejido adiposo son los macrófagos. Además, se ha visto que el incremento de la producción de adipocinas inflamatorias en obesidad está asociado al número de macrófagos infiltrados en éste. Especialmente existe una correlación entre el BMI y el número de macrófagos en el VAT [132]. Los macrófagos infiltrados en el tejido adiposo (ATMs), en función de los estímulos del entorno, pueden cambiar la expresión de marcadores de superficie, como son los receptores de manosa, los receptores *scavenger* o distintas integrinas, así como modular su actividad endocítica, activándose y especializándose en cumplir un papel proinflamatorio (vía clásica o polarización M1) o antiinflamatorio (vía alternativa o polarización M2). Se cree que son reclutados por la abundancia de adipocitos necróticos que necesitan ser reabsorbidos, debido a su capacidad para capturar lipoproteínas, debris, hemoglobina y glicoproteínas. Así, los M1 secretarían citoquinas proinflamatorias como $TNF\alpha$, IL-6, y IL- β ; y los M2 antiinflamatorias como IL-10 y el antagonista del receptor de IL- β . En modelos murinos se ha visto que las dietas altas en grasas derivan en la diferenciación de macrófagos desde M2 hacia tipo M1,

disminuyendo la expresión de IL10, Ym1 y arginasa, y aumentando la de TNF α e iNOS [133]. Por otro lado, la pérdida de peso promueve una concurrencia de macrófagos al tipo M2 en el TA de pacientes obesos [134].

5.3.3/ Propagación de la inflamación. Inflamación sistémica

Dado que el VAT es especialmente propenso a alteraciones inflamatorias y libera adipocinas a la vena porta, sus macrófagos infiltrados contribuyen a producir lesiones fibroinflamatorias en el hígado [58]. El TNF α estimula la lipogénesis hepática y la hiperlipidemia. La esteatosis hepática, a menudo asociada a la obesidad, produce una inflamación de bajo grado en el hígado a través de la activación de NF κ B. De la misma manera, la esteatohepatitis puede darse en obesidad debido a respuestas de estrés y proinflamatorias en el hepatocito, probablemente mediante la activación de TLR4 por FAs [88]. La producción de IL-6 trunca la señalización de la insulina en los hepatocitos al aumentar la expresión de SOCS3 [135]. En conjunto, se intuye un círculo vicioso de agravamiento de la resistencia a insulina debido a la esteatosis hepática y la inflamación [58]. Recientes publicaciones apuntan a que los perfiles M1/M2 de polarización de las células de Kupffer, los macrófagos residentes del hígado, controlan crucialmente la sensibilidad a insulina [136]. Así mismo, el bloqueo selectivo de NF κ B en los hepatocitos mejora la sensibilidad a insulina incluso en entornos que promueven la esteatosis [137].

Se cree que las citoquinas inflamatorias inducidas por obesidad, como TNF α e IL-6, que desajustan la sensibilidad a insulina del músculo, pero también los mediadores antiinflamatorios como IL-10 y adiponectina, derivan de la inflamación sistémica que se origina en el tejido adiposo [138]. Se ha observado una sobreexpresión de TNF α en músculo correlacionada con fosforilaciones inhibidas en Ser de IRS en mujeres obesas insulinoresistentes con previa DM gestacional, las cuales se encuentran entre el mayor riesgo de T2DM [139], indicando que la inflamación también ocurre en músculo produciendo una resistencia a insulina tanto local como sistémica. Además, el endotelio vascular también expresa TLR4, por lo que los altos niveles de FAs, a través

de estos receptores, también contribuirían tanto al riesgo metabólico como cardiovascular en la obesidad.

Se cree que los macrófagos podrían estar cumpliendo distintas funciones en respuesta a factores del entorno, manteniendo o desajustando el metabolismo energético, mostrando un perfil más inflamatorio en obesidad (y desajustando la señalización de insulina) y más antiinflamatorio en condiciones no obesas (manteniendo las funciones tisulares), además de controlar la infiltración de neutrófilos, funciones íntimamente asociadas con la ingesta y la composición corporal. Mantendrían así, un papel homeostático en la integración del metabolismo energético y la inmunidad.

Modelos murinos deficientes para PPAR γ en macrófagos, ven truncada la activación M2 en las células de Kupffer, lo que se ha relacionado con un incremento del depósito de grasa al ser alimentados con HFD [136]. Así mismo, se ha observado que una población heterogénea de macrófagos también estaría modulando la homeostasis energética en condiciones fisiológicas: depleción de los macrófagos tisulares se reduce notablemente el peso, incluyendo la masa grasa y no grasa, al inhibir la ingesta. Se ha visto que esta depleción aumenta la producción de citoquinas proinflamatorias y sus niveles circulantes, sugiriendo un desequilibrio del balance inmune, por lo que se ha concluido que debe existir una regulación recíproca entre el balance inmune y el metabolismo energético [140]. Es interesante remarcar que la pérdida de peso también induce la infiltración de los ATMs, donde éstos regulan la lipólisis sin inducir inflamación [141].

Una importante función de los macrófagos es la limpieza de neutrófilos apoptóticos de los lugares de inflamación. Se ha visto que la depleción de macrófagos, conduce a un importante aumento en la infiltración de neutrófilos en estos tejidos, donde se dispara la expresión de quimiocinas atrayentes como CXCL2 y citoquinas como G-CSF, sugiriendo que son factores reprimidos por los macrófagos en condiciones fisiológicas [140]. La depleción de macrófagos produce una bajada significativa en los niveles plasmáticos de leptina, indicando que no es la responsable de la bajada en la ingesta y la masa grasa, si no que se debe al aumento en la fosforilación de STAT3, un factor de transcripción hipotalámico que media los efectos de leptina y otras citoquinas

inflamatorias sobre la ingesta [140], a la vez que se activan vías de señalización de JNK y estrés del ER en el hipotálamo.

Actualmente, se acepta la idea de que la inflamación crónica asociada a la obesidad se caracteriza por la producción anormal de metabolitos y citoquinas citados previamente ($\text{TNF-}\alpha$, FA, IL-1, IL-6), y ciertas adipoquinas (leptina, adiponectina, adipolina) que se describirán a continuación.

6/ Las adipoquinas. Desregulación en la resistencia a insulina

Las adipoquinas o adipocitoquinas son un conjunto de citoquinas secretadas principalmente por el tejido adiposo. Varias de ellas han sido relacionadas con el desarrollo de la resistencia a insulina, de ahí que hayan cobrado importancia en la patofisiología de la obesidad y su relación con la T2DM.

6.1/ Adipsina

La adipsina ha sido la primera adipoquina en ser descrita [142]. Aparece disminuida, tanto a nivel de mRNA como de proteína circulante, en muchos modelos animales de obesidad y diabetes [143]. A diferencia de en roedores, en humanos también es expresada por macrófagos [144]. Posteriormente ha resultado ser el factor D del complemento [145], que cataliza el paso limitante para la activación de la vía alternativa del complemento. C3a, un péptido generado a partir de la adipsina, se ha revelado como un potente secretagogo de la insulina [146]. Recientemente se ha encontrado que los pacientes con T2DM con fallo en sus células β son deficientes en adipsina [146], indicando que la vía de la adipsina/C3a conecta la función adipocitaria con la fisiología de la célula β , por lo que la manipulación de esta vía abre nuevas vías a las terapias en la T2DM.

6.2/ Resistina

La resistina, codificada en humanos por el gen RETN, es una hormona producida por el tejido adiposo en roedores y por células inmunes y epiteliales en humanos, que se

ha asociado con niveles aumentados de glucosa en sangre y una mayor liberación de glucosa hepática en ratones [147,148], y cuya administración *in vivo* desajusta la sensibilidad a insulina [149]. También se le han atribuido funciones proinflamatorias y la inducción de la secreción de otras citoquinas como IL-6 [150]. Sin embargo, su implicación directa en la resistencia a insulina ha quedado en entredicho en estudios posteriores [151,152].

6.3/ Leptina

La leptina (LEP o proteína OB) es una hormona de saciedad, producida por los adipocitos, que inhibe la ingesta a través de neuronas hipotalámicas [153]. Aunque todavía existen dudas sobre su papel en los desórdenes metabólicos, varios estudios la han relacionado con la estimulación de la oxidación de FAs y con la contrarrestación de la resistencia a insulina [154]. Es una proteína de 16 KDa que regula la ingesta y el gasto energético además de tener efectos en la reproducción, regulación inmune y otros sistemas endocrinos. Los modelos murinos que carecen de ella (*ob/ob*) triplican su peso respecto a los controles, y la administración de la misma reduce la ingesta, el peso, incrementa la actividad física y la termogénesis [4]. Podría por tanto considerarse un "adipostato" al reflejar el grado de adiposidad del organismo, y comunicarle al cerebro que se frene la ingesta y se promueva el gasto energético. Sin embargo, se ha encontrado que en muchos casos sus niveles plasmáticos están aumentados en sobrepeso y obesidad, no ejerciendo por tanto un papel protector ante la adiposidad, facilitando esta resistencia a leptina la ganancia de peso. La leptina ejerce un efecto positivo sobre el metabolismo de la glucosa y, junto con la insulina, conforman el eje adipo-insular en el control del balance energético, donde la leptina ejerce un feedback negativo sobre la secreción de insulina, y ésta estimula la de leptina [155,156], quizá contribuyendo la desregulación de este sistema a la resistencia a insulina. Aunque su papel como molécula sensibilizadora a insulina todavía debe ser investigado, se ha observado que la leptina activa AMPK especialmente en el músculo y cerebro, activando la oxidación de FAs y previniendo la acumulación ectópica de grasa, y por ende la resistencia a insulina.

6.4/ Adiponectina

La adiponectina es la hormona producida por el tejido adiposo más abundante en plasma, y sus niveles circulantes aparecen significativamente disminuidos en sobrepeso y obesidad, en contra de lo que cabría esperar al presentar más adiposidad total. Está codificada por el gen ADIPOQ y actúa a través de dos receptores AdipoR1 y AdipoR2 y sus cascadas de señalización asociadas. Es por tanto una adipocina desregulada en obesidad, y su forma molecular de mayor peso se considera que tiene un importante efecto de sensibilización a la insulina [157,158]. Así mismo, en modelos murinos, se le han atribuido funciones antiaterogénicas, antiinflamatorias e insulinosensibilizadoras [159-161]. También protege la supervivencia y función de las células β . Niveles plasmáticos bajos de la misma –hipoadiponectinemia- se han asociado con la resistencia a insulina, dislipidemia y T2DM [162,163].

Se cree que al presentar valores plasmáticos fisiológicos tan altos, su función debe ser regulada a nivel de la expresión de sus receptores y función. Conforman un bucle de regulación recíproca junto a IL-6 y TNF α , donde cada uno regula la expresión de los otros. Cuando los niveles de éstos aumentan, disminuyen abruptamente la expresión de adiponectina en respuesta a estímulos de sobreentrenamiento o hiperglicemia, rompiendo el equilibrio entre moléculas pro y antiinflamatorias y aumentando la susceptibilidad a la resistencia a insulina [164-166]. Por el contrario, su expresión y secreción es estimulada por agonistas de PPAR α como los fármacos antidiabéticos, como son las tiazolidinedionas [167,168]. Al igual que la leptina, promueve la actividad AMPK y el transporte y la oxidación de FAs, al aumentar la expresión de las proteínas implicadas. La resistencia a adiponectina se traduce en una disminución de la oxidación –incrementándose los niveles de DAG y cæmida en plasma- y un desequilibrio en la fosforilación de señales clave como Akt y AS160 en músculo, desajustando la translocación de GLUT4, como se da característicamente en la resistencia a insulina [169].

6.5/ Adipolina

La adipolina está codificada por el gen FAM132A/CTRP12 y, al igual que la adiponectina, es producida y secretada por el tejido adiposo, cumple un papel en el control glicémico y la sensibilización a insulina, sus niveles plasmáticos aparecen disminuidos en la obesidad, y al administrarla en modelos de ratones obesos y diabéticos, mejora la sensibilidad, la tolerancia a la glucosa, reduce la inflamación y la adiposidad y disminuye la acumulación de lípidos inflamados [170,171]. De forma similar a la adiponectina, la inducción de la inflamación y el estrés del ER reduce la expresión de la adipolina [171]. Además, se ha encontrado una correlación negativa entre los niveles circulantes de adipolina y resistina. Todo esto sugiere que contrarresta la inflamación crónica que suele acompañar a la obesidad y la insulinoresistencia.

Se ha visto que la adipolina actúa incrementando la señalización de la vía de insulina dependiente de PI3K, aumentando la fosforilación de señales como IRS, Akt o MAPK, además de disminuir la expresión de enzimas gluconeogénicas en el hígado, como la glucosa-6-fosfatasa [170].

Los ratones DIO muestran niveles aumentados de furina, una proteasa convertida en prototípica, asociados a un perfil inflamatorio que recuerda a la inflamación de bajo grado que cursa con la obesidad. La sobreexpresión de furina en el tejido adiposo resulta en una mayor proporción de la forma procesada de la adipolina, más abundante en suero que su forma completa, pero probablemente menos funcional estimulando la señalización de insulina. En este sentido, se ha visto que la forma procesada de la adipolina activa preferentemente la vía de las MAPKs, mientras que la completa activaría Akt, estimulando la captación de glucosa mediada por insulina en adipocitos 3T3-L1 [172].

De la misma forma, el TNF α es procesado por la enzima convertidora de TNF α (TACE), la cual a su vez depende de la furina para su maduración [173]. Dicho incremento en los niveles de furina podría facilitar la producción de TNF α cursando con la inflamación crónica y la inhibición de las adipocinas insulino-sensibilizadoras como la adipolina y la adiponectina [174,175]. Así este mecanismo ayudaría a explicar

la dramática bajada en la expresión de estas adipocinas en obesidad, donde el aumento de masa grasa llevaría a suponer una mayor producción desde los adipocitos [4].

6.6/ Adipo-mioquinas

Se ha restringido el término mioquinas para aquellas proteínas secretadas desde el músculo esquelético, excluyendo aquellas que son también secretadas por otros tipos celulares y aquellas que han sido descritas sólo a nivel de mRNA. Sin embargo, muchas de las mioquinas reguladas por la contracción descritas en la literatura, se ha encontrado que también son secretadas por los adipocitos. Este conjunto de proteínas reciben el nombre de adipo-mioquinas, y participan en el diálogo endocrino con otros tejidos. Dependiendo del alcance y de su cinética una vez liberadas en el suero, estas moléculas pueden cumplir efectos beneficiosos o adversos en tejidos diana.

6.6.1/ Pentraxina 3

Las pentraxinas son una superfamilia de proteínas filogenéticamente conservadas desde los arácnidos a los mamíferos, aunque no en todas las especies, y caracterizadas por la presencia en su extremo carboxi-terminal de 200 aminoácidos que conforman el dominio pentraxina. El término pentraxina fue empleado por primera vez para la CRP. En base a la estructura primaria de sus subunidades, las pentraxinas se dividen en cortas y largas. Entre las funciones que se le atribuyen están la de reconocer un amplio abanico de moléculas, patógenas exógenas y propias alteradas, además de funcionar, de forma específica de especie como proteínas de fase aguda.

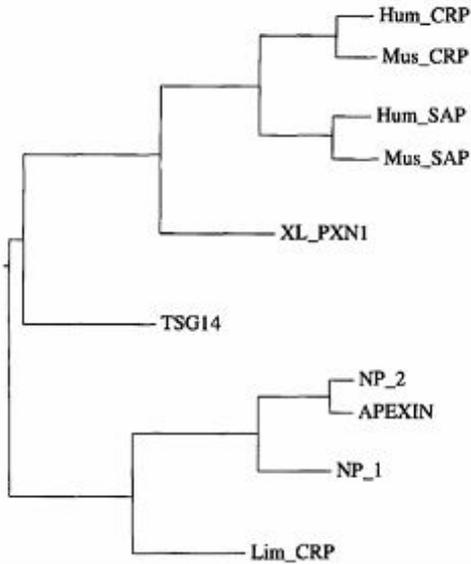
Las pentraxinas se componen de monómeros con una topología " *β -jelly roll*" que se ensamblan preferentemente en estructuras pentaméricas asociadas no covalentemente [176]. CRP y SAP son prototipos de pentraxinas cortas, principalmente producidas en el hígado en respuesta a señales inflamatorias, especialmente IL-6, y funcionan como proteínas de fase aguda en hombre y ratón respectivamente [177]

Del mismo modo, PTX3 también conocida como TSG-14 (*TNF-Stimulated Gene 14*) o TNFAIP5 (*Tumor Necrosis Factor-Alpha Protein 5*), es el prototipo de la subfamilia de las pentraxinas largas, identificadas en los años noventa como moléculas inducibles por citoquinas y expresadas en tejidos específicos. El gen PTX3 codifica una proteína de 45kDa que se ensambla para formar polímeros de alto peso molecular al unirse por puentes S-S intercatenarios. El dominio C-terminal (203 aa) comparte homología con el de las clásicas pentraxinas cortas, mientras que el N-terminal (178 aa) no presenta homología significativa con ninguna otra conocida [77]. Difiere además de CRP y SAP tanto por su organización génica, como por sus propiedades de unión a ligando.

Otros ejemplos de pentraxinas largas son la pentraxina neuronal 1 (NPTX1 o NP1) y pentraxina neuronal 2 (NPTX2 o NP2). NPTX1 fue identificada en rata como una proteína que podría mediar en la captación de material sináptico y la toxina presináptica taipoxina del veneno de serpiente. Otros ejemplos de PTXs largas son: la apexina en espermatozoides de cerdo guineano, pentraxina 1 de *Xenopus laevis* (XL-PXN1), o el receptor neuronal de pentraxina (NPR), una molécula transmembrana del sistema nervioso. Los estudios filogenéticos muestran la existencia de dos familias de pentraxinas (Fig. 6), expresadas separadamente en cerebro humano y en otros tejidos

PTX3 es una proteína plasmática de fase aguda cuya concentración está desregulada en la obesidad y el síndrome metabólico. Es producida en respuesta a señales proinflamatorias en fagocitos mononucleares [178], células dendríticas [179], fibroblastos [178], células endoteliales [178], hepáticas [180], mioblastos [178], sinoviocitos, células epiteliales de pulmón, epiteliales renales, adipocitos [181] y células de músculo liso [182]. Este origen celular diverso contrasta con el de la CRP, que es producida casi exclusivamente en el hígado [183].

A



B

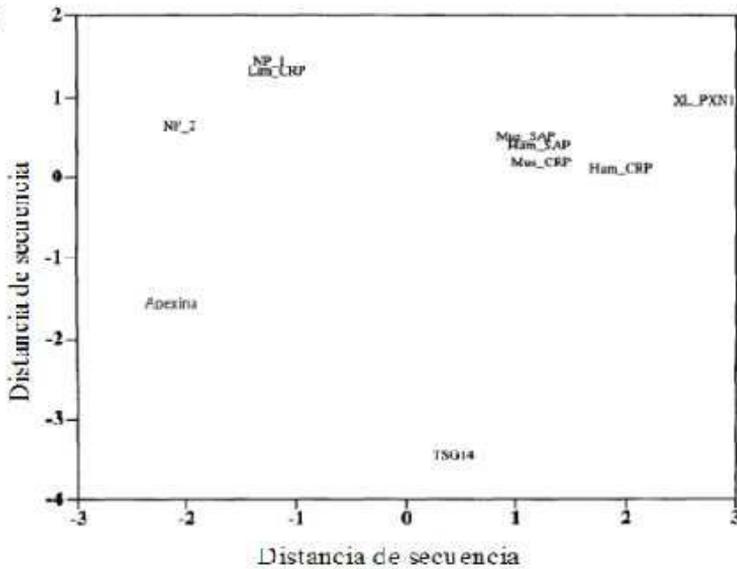


Figura 6. Relación filogenética entre los miembros de la familia pentraxina. (A) Árbol de proximidad evolutiva, mostrando la relación entre PTX3 respecto a otras pentraxinas largas como NP1, NP2, XL-PXN1 y apexina. (B) El análisis multidimensional de distancias de secuencia, sin asumir relación evolutiva alguna, muestra las diferencias entre secuencias pentraxina. Las unidades de cada componente principal son indicativas de la identidad de secuencia. El alineamiento múltiple de secuencias y la matriz de distancias geométricas fueron elaboradas empleando los algoritmos de alineamiento del CLUSTAL W. *Adaptado de [184].*

Si bien las clásicas pentraxinas cortas CRP y SAP han divergido en secuencia y regulación del ratón al hombre, PTX3 se ha conservado a lo largo del proceso evolutivo, por lo que se estudio en modelos murinos modificados genéticamente, han aportado un nuevo nivel de entendimiento del rol de las pentraxinas en inmunidad y homeostasis: PTX3 ejerce un papel *in vivo* complejo y no redundante en el reconocimiento de patógenos, modulando el sistema del complemento al unir C1q y facilitando su identificación por macrófagos y células dendríticas [185]. Además, supone un punto medio entre las vías cruzadas de inmunidad e inflamación, atribuyéndosele también un papel en la construcción de la matriz extracelular y en la fertilidad femenina.

Se ha observado que PTX3 presenta una N-glicosidación que suma unos 5 kDa a la masa total del monómero -pasando de 45 kDa a unos 50 kDa- [186]. Todavía se desconoce en gran parte la configuración de estos oligosacáridos unidos a PTX3 y el papel funcional que desempeñan (Fig. 7). Éstos pueden afectar a su actividad de distintos modos: enmascarando gran parte de la molécula para el reconocimiento del ligando, participando en su plegamiento, y constituyendo sitios de unión su superficie [186]. El proceso inflamatorio puede inducir cambios significativos en los oligosacáridos de proteínas de fase aguda, y variaciones en su glicosilación pueden valer de indicadores diagnósticos de diversas enfermedades.

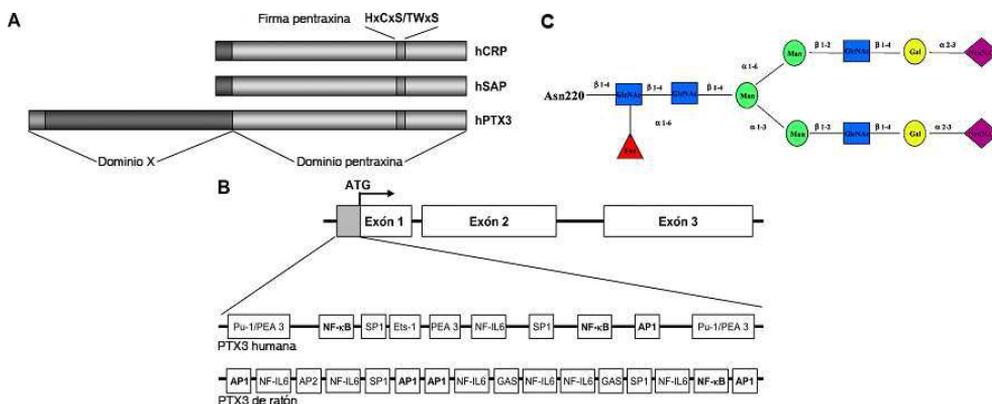


Figura 7. Características moleculares de PTX3 (A) Comparación de PTX3 con las pentraxinas cortas CRP y SAP. (B) El gen humano de PTX3 está organizado en 3 exones y se localiza en el cromosoma 3q24-28. Se muestran los sitios de unión del factor de transcripción en la región promotora del gen de PTX3 humano y de ratón. *Adaptado de [187].* (C) Conformaciones representativas de un oligosacárido biantenal monofucosilado y desializado. *Adaptado de [186].*

Las concentraciones plasmáticas de PTX3 se encuentran inversamente correlacionadas con la masa grasa, los niveles de leptina, CRP e IL-6 en individuos sanos, dependiendo de cambios en la actividad física y el balance energético [188]. Así, se han descrito correlaciones negativas entre sus niveles plasmáticos y los de TAGs y BMI, y niveles menores de PTX3 en individuos con síndrome metabólico [189,190]. Sin embargo, varios estudios recientes discrepan de estas asociaciones [191,192], encontrando una asociación positiva entre PTX3, la obesidad, y algunos factores de riesgo cardiovascular que asocian la función inflamatoria de esta pentraxina con un peor perfil cardiovascular. Existe poca información acerca de su expresión en tejido adiposo, aunque se han encontrado niveles de mRNA mayores en el tejido adiposo blanco de modelos de ratones *ob/ob*, *db/db* que en ratones control [181]. En humanos, sólo existe un estudio previo en el que se evaluó la expresión de PTX3 en el tejido adiposo de sujetos delgados y obesos [193]. Su expresión tiende a ser mayor en el tejido adiposo visceral de individuos obesos que en delgados.

6.6.2/ CCDC80

La proteína CCDC80 (*Coiled-Coil Domain Containing 80*) es una proteína secretada por los adipocitos que regula la homeostasis energética en ratones obesos inducidos por la dieta. Su relación con la obesidad y el significado de sus niveles plasmáticos en humanos son desconocidos. En la obesidad, el perfil de expresión de adipoquinas cambia en respuesta a la cantidad y la condición de órgano adiposo [194]. La alteración de la secreción de adipoquinas se considera que contribuye al desarrollo de los desórdenes asociados a la obesidad, como son la resistencia a insulina [175], la enfermedad cardiovascular [195] o la esteatosis hepática [196].

CCDC80 es un gen relacionado con la obesidad, que ha sido identificado como sobreexpresado en tejido adiposo marrón del ratón deficiente en el receptor de bombesina subtipo 3, un modelo murino de obesidad leve de inicio tardío [197]. Aunque existe controversia al respecto, se ha detectado una menor expresión de este gen en el tejido adiposo blanco de modelos murinos obesos, como el *ob/ob* KKAY y obesos inducidos por la dieta [198]. CCDC80 se expresa a nivel de mRNA predominantemente en el tejido adiposo blanco, tanto en humanos como en ratones

[198,199]. Es también expresado por los preadipocitos de células primarias humanas cultivadas [198] como en las las células 3T3-L1 derivadas [199]. En éstas últimas los niveles de mRNA de *CCDC80* disminuyen transitoriamente durante el proceso de diferenciación [198,199]. En estos adipocitos, este gen se ve reprimido por insulina, TNF- α , H₂O₂ e hipoxia [198]; y por insulina, dexametasona y 3-isobutil-metilxantina en preadipocitos confluentes [199]. Se ha observado que *Ccdc80* juega un papel dual en la adipogénesis in vitro mediante mecanismos que implican la señalización Wnt/ β -catenina y los factores de transcripción C/EBP α y PPAR γ [199]. Sin embargo, su delección no afecta al desarrollo normal del tejido adiposo blanco en ratones [200]. La función fisiológica de *Ccdc80* se ha puesto en relieve en este modelo murino donde el gen fue truncado [200]; estos ratones muestran una mayor sensibilidad a la intolerancia a glucosa inducida por la HFD, así como un desajuste en la secreción de insulina estimulada por glucosa; además, ciertos genes implicados en los ciclos circadianos son simultáneamente regulados en el tejido adiposo blanco, músculo y páncreas. Esto indica que es un nuevo modulador de la homeostasis energética y de la glucosa durante la obesidad inducida por la dieta. Por tanto, aunque se podría considerar a *Ccdc80* como una adipo-mioquina, cuya expresión está alterada en modelos murinos obesos y ejerce un control metabólico en ratones obesos inducidos por la dieta, el papel de *CCDC80* en la obesidad humana todavía no ha sido dilucidado.

OBJETIVOS

Plasma PTX3 Protein Levels Inversely Correlate with Insulin Secretion and Obesity, whereas Visceral Adipose Tissue PTX3 Gene Expression is Increased in Obesity

El objetivo de este trabajo es explorar la asociación de los niveles plasmáticos de PTX3 con diversos marcadores inflamatorios y con la secreción de insulina estimulada por glucosa. Además, analizar la regulación de la expresión del gen de PTX3 y la secreción de esta proteína por adipocitos SGBS cultivados en respuesta a factores relacionados con la obesidad como la insulina, citoquinas proinflamatorias, promotores de especies reactivas de oxígeno e hipoxia.

Se medirán los niveles plasmáticos de PTX3 en una primera cohorte (cohorte-1) compuesta por 27 individuos delgados ($BMI \leq 25 \text{ kg/m}^2$) y 48 con sobrepeso ($BMI 25-30 \text{ kg/m}^2$). En una segunda cohorte (cohorte-2), compuesta por 19 individuos delgados, 28 con sobrepeso y 15 obesos ($BMI > 30 \text{ kg/m}^2$) se analizarán los niveles plasmáticos de PTX3 y sus niveles de expresión génica en VAT y SAT en el tejido adiposo total, y las fracciones estromovascular y subcutánea. Se empleará la línea de preadipocitos humanos SGBS para el estudio de la producción de PTX3 en respuesta a $IL-\beta$, $TNF-\alpha$, $IL-6$, antimicina A, insulina, H_2O_2 e hipoxia.

Adipose Tissue and Plasma CCDC80 Protein in Relation to Human Obesity

El objetivo de este trabajo es analizar la expresión de CCDC80 en tejido adiposo visceral y subcutáneo. Además, cuantificar sus niveles plasmáticos en relación con la obesidad y complicaciones relacionadas con ella en humanos.

Para ello usaremos muestras pareadas de depósito de grasa visceral (VAT) y subcutáneo (SAT) procedentes de individuos delgados y obesos, y la línea de preadipocitos SGBS humanos. Los niveles plasmáticos de CCDC80 se analizarán en dos cohortes: una de sujetos con distintos grados de obesidad (cohorte-A: n= 48, BMI 20 to 40 kg/m²) y otra de sujetos obesos mórbidos (cohorte-B: n=2, BMI 35 to 60 kg/m²).

Fatty Acid Transport Protein 1 (FATP1) Localizes in Mitochondria in Mouse Skeletal Muscle and Regulates Lipid and Ketone Body Disposal

El objetivo de este trabajo es arrojar nueva luz sobre la localización subcelular de FATP1 y su papel en el control del metabolismo de AAs en el músculo esquelético. Examinamos la posible localización mitocondrial de FATP1 en fracciones subcelulares, obtenidas por centrifugación diferencial, en músculo esquelético de roedores. Por otra parte, sobreexpresaremos FATP1 en músculo gastrocnemius de ratón con dieta normal, mediante electroporación, para examinar sus efectos en el control de la disposición de FAs y cuerpos cetónicos respecto a la glucosa en tiras de gastrocnemius aisladas de ratón. *[Se describe sólo la parte experimental que he desempeñado]*

PUBLICACIONES

PUBLICACIÓN 1

Plasma PTX3 Protein Levels Inversely Correlate with Insulin Secretion and Obesity, whereas Visceral Adipose Tissue PTX3 Gene Expression is Increased in Obesity

Osorio-Conles O, Guitart M, Chacón MR, Maymo-Masip E, Moreno-Navarrete JM, Montori-Grau M, Naf S, Fernandez-Real JM, Vendrell J, Gómez-Foix AM. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2011 Dec;301(6):E1254-61.doi: 10.1152/ajpendo.00163.2011.Epub 2011 Sep 6.

RESUMEN

Los niveles plasmáticos de PTX3 correlacionan inversamente con la secreción de insulina y la obesidad, mientras su expresión génica en el tejido adiposo visceral se ve incrementada en obesidad

La proteína pentraxina 3 (PTX3) es una proteína de fase aguda cuya concentración plasmática está desregulada en la obesidad humana y el síndrome metabólico. En este trabajo exploramos su relación con la secreción de insulina y la sensibilidad a ésta, marcadores de obesidad, y la expresión génica de PTX3 en el tejido adiposo. Los niveles plasmáticos de PTX3 fueron analizados en una cohorte (cohorte 1) compuesta por 27 individuos delgados ($BMI \leq 25 \text{ kg/m}^2$) y 48 con sobrepeso ($BMI 25\text{--}30 \text{ kg/m}^2$). En dicha cohorte, los valores plasmáticos de PTX3 correlacionaron negativamente con los niveles basales de triglicéridos y la secreción de insulina tras la administración oral de glucosa. En una segunda cohorte se analizaron los niveles plasmáticos y la expresión génica de PTX3 en los depósitos de tejido adiposo visceral (VAT), subcutáneo (SAT), en el tejido adiposo completo así como en las fracciones adipocitaria y estromovascular. Dicha cohorte 2 se compuso de 19 individuos delgados, 28 con sobrepeso y 15 obesos ($BMI > 30 \text{ kg/m}^2$). En ella se observó una asociación inversa con el peso corporal y la relación cintura/cadera. En los depósitos VAT los niveles de mRNA de PTX3 fueron mayores en individuos con $BMI > 25 \text{ kg/m}^2$ que en delgados, correlacionando positivamente con los niveles de mRNA de IL-1 β , y mayores en la fracción adipocitaria que en la estromovascular. Se usó la línea de preadipocitos humanos SGBS para estudiar la producción de PTX3 en respuesta a factores asociados a la obesidad. En los adipocitos SGBS, la expresión génica de PTX3 se incrementó en respuesta a IL-1 β y TNF α pero no en respuesta a IL-6 o insulina. En conclusión, la correlación negativa entre PTX3 y la secreción de insulina estimulada por glucosa sugiere que PTX3 cumple un papel en el control metabólico. La expresión génica de PTX3 se ve aumentada en el depósito VAT en la obesidad, pese a encontrarse unos menores niveles plasmáticos, y en respuesta a citoquinas proinflamatorias en adipocitos cultivados.

Tipo de artículo: *Research article*

Factor de impacto (según ResearchGate®, 2014)4.51

Participación del autor:

Obtención de cultivos celulares SGBS.

Extracción de RNA y determinación de los niveles de expresión génica mediante RT-PCR.

Extracción de proteína y cuantificación mediante inmunoblotting.

Determinación de los niveles plasmáticos mediante ELISA.

Participación en la redacción de la Introducción, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión del artículo.

Plasma PTX3 protein levels inversely correlate with insulin secretion and obesity, whereas visceral adipose tissue PTX3 gene expression is increased in obesity

O. Osorio-Conles,¹ M. Guitart,^{1,2} M. R. Chacón,^{2,3} E. Maymo-Masip,^{2,3} J. M. Moreno-Navarrete,⁴ M. Montori-Grau,^{1,2} S. Näf,^{2,3} J. M. Fernandez-Real,⁴ J. Vendrell,^{2,3} and A. M. Gómez-Foix^{1,2}

¹Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona, Barcelona;

²Centro de Investigación Biomedica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas; ³Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, Universitat Rovira i Virgili, IISPV, Tarragona; and ⁴Unit of Diabetes, Endocrinology, and Nutrition, "Hospital de Girona Dr. Josep Trueta", CiberOBN Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, Girona, Spain

Submitted 6 April 2011; accepted in final form 29 July 2011

Osorio-Conles O, Guitart M, Chacón MR, Maymo-Masip E, Moreno-Navarrete JM, Montori-Grau M, Näf S, Fernandez-Real JM, Vendrell J, Gómez-Foix AM. Plasma PTX3 protein levels inversely correlate with insulin secretion and obesity, whereas visceral adipose tissue PTX3 gene expression is increased in obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301: E1254–E1261, 2011. First published September 6, 2011; doi:10.1152/ajpendo.00163.2011.—Plasma acute-phase protein pentraxin 3 (PTX3) concentration is dysregulated in human obesity and metabolic syndrome. Here, we explore its relationship with insulin secretion and sensitivity, obesity markers, and adipose tissue PTX3 gene expression. Plasma PTX3 protein levels were analyzed in a cohort composed of 27 lean [body mass index (BMI) ≤ 25 kg/m²] and 48 overweight (BMI 25–30 kg/m²) men (*cohort 1*). In this cohort, plasma PTX3 was negatively correlated with fasting triglyceride levels and insulin secretion after intravenous and oral glucose administration. Plasma PTX3 protein and PTX3 gene expression in visceral (VAT) and subcutaneous (SAT) whole adipose tissue and adipocyte and stromovascular fractions were analyzed in *cohort 2*, which was composed of 19 lean, 28 overweight, and 15 obese subjects (BMI >30 kg/m²). An inverse association with body weight and waist/hip ratio was observed in *cohort 2*. In VAT depots, PTX3 mRNA levels were higher in subjects with BMI >25 kg/m² than in lean subjects, positively correlated with IL-1 β mRNA levels, and higher in the adipocyte than stromovascular fraction. Human preadipocyte SGBS cell line was used to study PTX3 production in response to factors that obesity entails. In SGBS adipocytes, PTX3 gene expression was enhanced by IL-1 β and TNF α but not IL-6 or insulin. In conclusion, the negative correlation between PTX3 and glucose-stimulated insulin secretion suggests a role for PTX3 in metabolic control. PTX3 gene expression is upregulated in VAT depots in obesity, despite lower plasma PTX3 protein, and by some proinflammatory cytokines in cultured adipocytes.

protein pentraxin 3; pentraxins; insulin sensitivity; proinflammatory cytokines

OBESITY RESULTS IN A CHRONIC low-grade systemic inflammatory state, which is brought about by adipose tissue (AT), mainly from visceral depots. In AT, macrophage infiltration and production of proinflammatory cytokines (mostly IL-6 and TNF α) are increased (5), particularly in the nonadipose cell fraction (14). Obesity, and especially visceral adiposity, is linked to increased levels of circulating inflammatory markers, such as

acute-phase pentraxin C-reactive protein (CRP), as a consequence of the high levels of IL-6 released from AT depots (5). Both the local (in AT) and systemic inflammation present in obesity have been associated with an increased risk of developing type 2 diabetes and cardiovascular disease (5, 39).

Pentraxins are key components of the humoral innate immune system (27) characterized by the presence of a structural motif in their COOH-terminal region, the pentraxin domain (16). The pentraxin family (27) is formed of short pentraxins, such as CRP, and long pentraxins, such as protein pentraxin 3 (PTX3) (9), also called TNF-stimulated gene (TSG)-14 protein (24). PTX3 is a secreted acute-phase protein that conserves the COOH-terminal pentraxin domain but has no homology in its NH₂-terminal half with any other known protein (9). This has led to the suggestion that it may have differential biological functions from those of other pentraxin family members. Indeed, PTX3 has different cell-specific gene expression and ligand-binding properties from CRP (8). PTX3 is produced in response to proinflammatory signals by mononuclear phagocytes (3, 20), myeloid dendritic cells (12), fibroblasts (9, 20, 23), endothelial cells (9, 20), hepatic cells (9), myoblasts (20), synoviocytes (26), lung epithelial cells (17), renal epithelial cells (32), adipocytes (1), AT-derived mesenchymal stem cells (25), and smooth muscle cells (11). Expression of the PTX3 gene increases in human cultured myotubes compared with the skeletal muscle tissue (38). Finally, the *in vivo* expression of the PTX3 gene in mouse tissues is high in heart and limb muscle after intravenous injection with the immune stimulator lipopolysaccharide, whereas a weaker signal is detected in lung, ovary, and thymus (20). This diverse cellular origin is in contrast to that of CRP, which is produced almost exclusively in the liver (36).

Previous studies have reported that PTX3 production is dysregulated in obesity. Plasma PTX3 protein concentrations were inversely correlated with fat mass, leptin, CRP, and IL-6 in healthy subjects undergoing changes in physical activity and energy balance (7). Likewise, negative correlations between concentrations of plasma PTX3 protein and triglycerides and BMI and lower PTX3 values in individuals with metabolic syndrome were described in a large population of subjects (34, 44). However, some recent studies (30, 45) disagree with these associations, reporting a positive link between PTX3, obesity, and some cardiovascular risk factors that associates the inflammatory function of this pentraxin with a worse cardiovascular profile. There is little information about PTX3 gene expression

Address for reprint requests and other correspondence: O. Osorio-Conles, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat de Barcelona, Diagonal, 645, E-08028-Barcelona, Spain (e-mail: osoriorconles@hotmail.com).

in AT, although PTX3 mRNA levels are higher in the white AT of genetically obese (*ob/ob*) and obese diabetic (*db/db*) mice than in controls (1). In humans, there is only one previous study in which PTX3 gene expression was evaluated in AT from lean and obese patients (2). PTX3 gene expression tended to be higher in the VAT depot of obese subjects compared with their nonobese counterparts. After controlling for multiple variables, only HDL (inversely) and fibrinogen (directly) plasma levels were found to be unique determinants of VAT-PTX3 gene expression in the whole population.

Here, we explore the association of plasma PTX3 protein with several metabolic markers and with glucose-stimulated insulin secretion. We assess PTX3 gene expression in depth in visceral (VAT) and subcutaneous AT (SAT) in a cohort with a wide body mass index (BMI) range in both the adipocyte and stromovascular fractions. We also analyze the regulation of PTX3 gene expression and protein secretion by cultured Simpson-Golabi-Behmel syndrome (SGBS) adipocytes in response to factors that obesity entails, such as insulin, proinflammatory cytokines, promoters of reactive oxygen species (ROS), and hypoxia.

METHODS

Selection of study-participating subjects. Two cohorts were included in the study. *Cohort 1*, composed of 75 apparently healthy men, was selected by the "Hospital de Girona Dr. Josep Trueta" (Girona, Spain) for the study of insulin sensitivity and insulin secretion using the minimal model approach. Insulin sensitivity (S_I) was measured using the frequently sampled intravenous glucose tolerance test with minimal model analysis (31). Briefly, intravenous glucose (0.3 g/kg) was administered at time 0 and insulin (0.03 U/kg) at time +20 min. Insulin secretion was calculated from the frequently sampled intravenous glucose tolerance test as the incremental insulin response from 0 to 10 min after intravenous glucose [acute insulin response to glucose (AIRg)]. The time courses of serum glucose and insulin over 3 h were analyzed using the Minimal Model Program to calculate the S_I index (6). On another day, an oral glucose tolerance test (OGTT) was performed, following the American Diabetes Association recommendations. After a 12-h overnight fast, 75 g of glucose was ingested, and blood samples were collected through a catheter from an antecubital vein at 0, 30, 60, 90, and 120 min for serum glucose and insulin measurement.

Cohort 2 was recruited by the Endocrinology and Surgery Departments at the University Hospital Joan XXIII (Tarragona, Spain), as part of an AT biobank collection. Sixty-two subjects (24 females and 38 males; BMI range of 21.52 to 38.54 kg/m²) were selected, categorized by age, sex, and BMI, and classified as lean, overweight, and obese according to the World Health Organization criteria (42a). All of the subjects were Caucasian and reported steady body weight for ≥ 3 mo prior to the study. All of the subjects were scheduled for an elective surgical procedure (cholecystectomy or surgery for abdominal hernia) and had no metabolic diseases other than obesity. They had been free of any infections in the month preceding the study. Exclusion criteria were the presence of liver or renal diseases, malignancy, chronic inflammatory disease, and pharmacological treatments that may alter the lipid profile. BMI was calculated as body weight (kg) divided by height (m) squared and weight and height measured to the nearest 0.1 kg and 0.5 cm, respectively. Waist circumference was measured midway between the lowest rib margin and the iliac crest. Blood pressure was measured in the supine position on the right arm after a 10-min rest; a standard sphygmomanometer of appropriate cuff size was used, and the first and fifth phases were recorded. All patients had fasted overnight, for ≥ 12 h, before surgical procedure. Blood samples were collected before surgery from the antecubital vein. VAT

and SAT samples were obtained from all 62 subjects during the surgical procedure, washed in PBS, immediately frozen in liquid N₂, and stored at -80°C . For AT fractionation, fresh AT was finely diced, and small pieces were washed in PBS and incubated in medium 199 plus 4% BSA and 2 mg/ml collagenase type I (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) for 1 h at 37°C and then filtered (200 μm) and centrifuged for 5 min at 1,500 *g*. Mature adipocytes were removed from the top layer, and the pellet contained the stromovascular cells. Cells washed four times in PBS were stored at -80°C . The ethics committees of both Hospital de Girona Dr. Josep Trueta and University Hospital Joan XXIII approved the study, and informed consent was obtained from all participants.

Analytical methods. Glucose, cholesterol, triglyceride, and glycerol in plasma and nonesterified fatty acid in serum were determined in an ADVIA 1200 (Siemens, Munich, Germany) autoanalyzer using standard enzyme methods. HDL cholesterol was quantified after precipitation with polyethylene glycol 6000 at room temperature. Plasma insulin was determined by radioimmunoassay (Diagnostic Products, Los Angeles, CA); assay sensitivity was 2.6 mU/ml and coefficient of variation of intra- (IACV) and interassay (IRCV) $<5\%$. Serum leptin levels were determined by ELISA (Assaypro, St. Charles, MO); IACV and IRCV were 4 and 7.7%, respectively, and assay sensitivity was <150 pg/ml. The index of insulin resistance was determined by the homeostatic model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) (28). Soluble tumour necrosis factor receptor 2 was determined by enzyme IA (DiaSource, Nivelles, Belgium); the limit of detection was 0.1 ng/ml, and IACV and IRCV were <7 and $<9\%$, respectively. IL-6 was determined by enzyme IA (DiaSource), with assay sensitivity of 0.039 pg/ml and IACV and IRCV <9.8 and $<11.2\%$, respectively. PTX3 protein was measured in 10 μl of plasma and SGBS-conditioned medium samples by ELISA (Cosmo-Bio-Co, Tokyo, Japan), with limit of detection 0.1 ng/ml and IACV and IRCV <4.1 and $<4.3\%$, respectively.

Cell culture. The SGBS human preadipocyte cell line is derived from an infant with SGBS (42). Confluent SGBS preadipocytes were induced to differentiate to mature adipocytes, as described (10). Six hours before the addition of effectors, mature adipocytes were incubated with serum-depleted DMEM, and then the medium was replaced by 3 ml of fresh medium, which was added with the effectors studied, and incubation prolonged for 16 h at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air. We used TNF α (BioNova, Madrid, Spain), IL-1 β , IL-6, antimycin A, insulin, and H₂O₂ (Sigma-Aldrich). For hypoxia induction, after 6 h of preincubation with serum-depleted DMEM, the medium was replaced by 3 ml of fresh medium, and cells were incubated for 16 h at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 1% oxygen balanced with nitrogen. Serum-free conditioned media were collected at the end of the experiments, filtered (0.22 μm) to remove cells and debris, and stored at -20°C . Cell monolayers were rinsed in PBS, frozen in liquid N₂, and stored at -80°C .

Gene expression analysis. Total RNA was extracted from AT samples using the RNeasy lipid tissue midi kit and treated with 55URNase-free deoxyribonuclease (Qiagen, Hilden, Germany). The RNeasy Mini Kit (Qiagen) was used to extract total RNA from SGBS cells and AT fractions. Extracts were homogenized using a Polytron homogenizer.

RNA was retrotranscribed with TaqMan reagents from Applied Biosystems (Carlsbad, CA), using random hexamers and RNase inhibitor. Real-time PCR was performed using either an ABI Prism 7700 sequence detection system or a 7900HT fast real-time PCR system with the TaqMan universal PCR master mix and Gene Expression Assays. Probes for 18S rRNA (Hs99999901_s1), PTX3 (Hs00173615_m1), and IL-1 β (Hs00174097_m1) were used. SDS software 2.3 and RQ Manager 1.2 (Applied Biosystems) or the relative expression software tool program (37) were used to estimate the gene expression fold change by the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. For AT and fractionated AT samples, data were expressed as an *n*-fold difference

Table 1. Anthropometric and analytical characteristics of the healthy lean and overweight men cohort

Anthropometric and Analytical Characteristics	Healthy Men Cohort
Age, yr	50.7 ± 11.3
Weight, kg	75.8 ± 8.7
BMI, kg/m ²	25.8 ± 2.5
Waist, cm	88.1 ± 6.9
Waist/hip ratio, cm	0.91 ± 0.06
SBP, mmHg	123.7 ± 13.1
DBP, mmHg	78.8 ± 7.6
Fasting glucose, mM	5.27 ± 0.58
Insulin, μ IU/ml	8.1 ± 3.9
Log insulin sensitivity (10^{-4} min^{-1}), mU/l	0.58 ± 0.18
Log acute insulin response, min^{-1}	2.48 ± 0.36
Fasting triglyceride, mM	1.18 ± 0.84
Cholesterol, mM	5.38 ± 1.04
HDL cholesterol, mM	1.38 ± 0.36
PTX3, ng/ml	2.37 ± 1.09

Data are expressed as means \pm SD; $n = 75$. BMI, body mass index; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; PTX3, protein pentraxin 3.

relative to a calibrator (a mix of different depot samples). For SGBS cells, the 18S rRNA gene was used as the control to normalize the crossing point (C_p) for each probe assay. Data were expressed as mean values of $2^{-\Delta\Delta C_p}$ for upregulated and $1/2^{-\Delta\Delta C_p}$ for downregulated mRNA.

Immunoblotting analysis. Cell extracts were homogenized in buffer composed of 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 , 2 mg/ml benzamide, 2 mg/ml leupeptin, 1% (vol/vol) Nonidet P-40, and 1 mM dithiothreitol. Lysates were then gently rocked for 60 min at 4°C and stored at -80°C until analysis. Protein was resolved in 10% SDS-PAGE. Antibodies against PTX3 (WH0005806M2; Sigma-Aldrich) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; 2118; Cell Signaling Technology, Beverly, MA) were used. Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies were used, and membranes were developed with ECL Plus (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Protein bands were revealed and quantified using a LAS-3000 luminescent image analyzer (FujiFilm, Tokyo, Japan).

Statistical analysis. We used the SPSS/PC+ statistical package (version 16; SPSS, Chicago, IL). For clinical and anthropometrical variables, normally distributed data are expressed as means \pm SD or SE, and for variables with a non-Gaussian distribution, values are expressed as the median (75th percentile) to provide an easy measurement of the dispersion of the variable. For statistical analysis of expression variables, values that did not have a Gaussian distribution were logarithmically transformed or analyzed by nonparametrical tests. Comparisons between groups were performed by one-way ANOVA with a post hoc Bonferroni correction or by a Kruskal-Wallis nonparametric test when appropriate. Associations between quantitative variables were evaluated by Pearson correlation analysis or Spearman correlation for nonnormally distributed variables. The independence of the associations was evaluated by linear regression analysis. Statistical significance occurred if a computed two-tailed probability value was <0.050 . For cell culture experiments a general linear model repeated-measures test was used for the statistical analysis, and a two-tailed probability value <0.050 was considered as statistically significant.

RESULTS

Circulating plasma PTX3 protein. Plasma PTX3 protein concentration was assessed. Clinical and laboratory data for the participants in cohort 1 are summarized in Table 1. This cohort was composed of 27 lean ($\text{BMI} \leq 25 \text{ kg/m}^2$) and 48 overweight ($\text{BMI} 25\text{--}30 \text{ kg/m}^2$) subjects. No differences in the PTX3

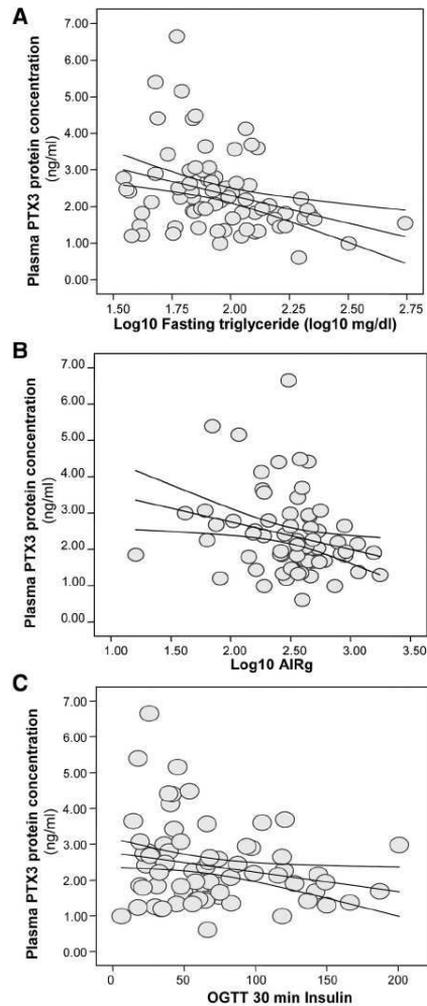


Fig. 1. Bivariate correlation analysis between plasma protein pentraxin 3 (PTX3) levels, plasma triglyceride levels, and parameters of insulin secretion in the lean and overweight men cohort. Scatter plot between plasma PTX3 protein concentration and fasting plasma triglyceride levels (A), acute insulin response to glucose (AIRg; B), and plasma insulin at 30 min in the oral glucose tolerance test (OGTT; C). Triglyceride and AIRg values were logarithmically transformed to normalize values. The statistical significance is PTX3 with total fasting triglyceride levels $r = -0.33$ and $P = 0.004$, with insulin secretion after intravenous glucose administration $r = -0.34$ and $P = 0.006$, and with insulin secretion after oral glucose administration $r = -0.25$ and $P = 0.04$.

levels between lean and overweight subjects were observed. A bivariate correlation analysis of the whole population (Fig. 1) showed that plasma PTX3 was negatively correlated with total fasting triglyceride levels and insulin secretion after both intravenous (AIRg) and oral glucose administration (measured as serum insulin at 30 min in the OGTT). S_1 was not associated with plasma PTX3 concentration ($r = -0.03$, $P = 0.7$). On univariate analysis, fasting triglyceride was associated with insulin secretion ($r = 0.30$, $P = 0.01$). On multivariate analysis, fasting triglyceride was associated with plasma PTX3 concentration, and this association remained significant after adjustments were made for BMI, age, and insulin secretion ($B = -1.625$, $P = 0.008$), contributing to 11.4% of the variance in plasma PTX3. The association with insulin secretion remained significant after controlling for BMI, waist diameter, and age ($P = 0.03$).

Anthropometric and analytical characteristics of the participants in the cohort 2 are summarized in Table 2. This cohort was composed of 19 lean (BMI ≤ 25 kg/m²), 28 overweight (BMI 25–30 kg/m²), and 15 obese (BMI >30 kg/m²) subjects. Systolic and diastolic blood pressure, fasting glucose, insulin levels, HOMA-IR indexes, and leptin levels were increased in the obese group compared with controls. Among the inflammatory markers, IL-6 concentration was higher in the obese group than in the overweight group. Plasma PTX3 protein showed a nonsignificant trend toward lower levels in the obese subjects, which remained nonsignificant when we gathered both overweight and obese subjects. Nevertheless, when we considered the whole cohort for the bivariate analysis, negative correlations of plasma PTX3 to both body weight ($r = -0.32$, $P = 0.016$) and waist/hip ratio ($r = -0.37$, $P = 0.006$) were observed. To strengthen the independence of these associations

as predictors of plasma PTX3 levels, a multiple regression analysis model was constructed, including the above-mentioned bivariate correlations, adjusting for age, sex, and smoking habits. The results presented a multiple correlation coefficient (r) of 0.475, and plasma PTX3 levels were predicted mainly by age and waist circumference ($B = 0.073$, $P = 0.0048$; and $B = -0.129$, $P < 0.001$, respectively). When we constructed a second regression model, including as independent variables some parameters associated with this pentraxin in previous studies, such as plasma triglyceride, insulin, and HDL cholesterol levels, the results did not show the dependence mentioned above.

PTX3 gene expression profile in SAT and VAT depots. Paired SAT and VAT samples were analyzed for PTX3 mRNA gene expression in the wide-ranging BMI cohort 2. No differences were observed between the three groups studied (Table 2). However, when we compared PTX3 mRNA levels in lean subjects (with BMI ≤ 25 kg/m²) with those of the combined obese and overweight subjects (with BMI >25 kg/m²), we found significantly higher VAT PTX3 transcript levels in subjects with BMI >25 kg/m² (127.42 ± 86.26 vs. 226.01 ± 27.16 , respectively, $P = 0.039$). No association between circulating plasma PTX3 levels and PTX3 gene expression in AT was observed.

PTX3 mRNA levels in isolated mature adipocytes and the stromovascular fraction of the VAT and SAT depots showed no differences related to obesity. When we considered all of the samples together, the PTX3 gene was expressed in the SAT depot at a similar level in both the adipocyte and stromovascular fractions (Fig. 2). In the VAT depot, PTX3 transcript levels were higher in mature adipocyte than in the stromovascular fraction. When we compared mature adipocytes from

Table 2. Anthropometric and analytical characteristics of the lean, overweight, and obese cohort according to BMI classification

Anthropometric and Analytical Characteristics	Lean (n = 19)	Overweight (n = 28)	Obese (n = 15)
Age, yr	51.68 \pm 15.96	57.14 \pm 14.96	57.40 \pm 12.75
Females/males (n)	6/13	12/16	6/9
Weight, kg	64.09 \pm 7.26	75.02 \pm 8.81§	91.60 \pm 13.82§
BMI, kg/m ²	23.11 \pm 1.59	27.29 \pm 1.24§	32.55 \pm 2.38§
Waist, cm	83.76 \pm 7.90	94.36 \pm 11.38§	109.14 \pm 12.28§
Waist/hip ratio, cm	0.90 \pm 0.06	0.94 \pm 0.12	0.94 \pm 0.11
SBP, mmHg	121.47 \pm 11.77	128.68 \pm 14.20	146.00 \pm 14.29†‡
DBP, mmHg	68.47 \pm 9.90	72.00 \pm 9.18	82.00 \pm 13.16*
Fasting glucose, mM	5.07 \pm 0.57	5.56 \pm 0.83	5.75 \pm 0.53*
Insulin, μ IU/ml	4.51 \pm 3.40	5.15 \pm 3.40	9.08 \pm 6.03* \perp
HOMA-IR	1.11 \pm 0.84	1.31 \pm 0.91	2.36 \pm 1.63*†
Triglyceride, mM	0.95 (1.57)	1.11 (1.47)	1.00 (1.30)
Cholesterol, mM	5.19 \pm 1.18	4.91 \pm 0.99	5.20 \pm 0.81
HDL cholesterol, mM	1.46 \pm 0.51	1.30 \pm 0.29	1.36 \pm 0.26
NEFA, mM	0.99 \pm 0.71	0.74 \pm 0.25	0.79 \pm 0.96
Glycerol, μ M	162.58 (299.45)	135.36 (205.01)	158.24 (286.42)
Leptin, ng/ml	2.16 (29.42)	9.90 (18.09)	27.59 (92.26)*‡
IL-6, pg/ml	1.38 (2.52)	1.04 (2.23)	2.53 (5.18) \perp
sTNFR2, ng/ml	3.54 (4.95)	3.19 (4.48)	3.73 (4.04)
PTX3, ng/ml	3.15 (4.40)	2.84 (3.43)	2.68 (3.38)
Relative mRNA levels (arbitrary units)			
PTX3 SAT	154.80 \pm 71.82	227.50 \pm 24.03	134.90 \pm 66.72
PTX3 VAT	127.42 \pm 86.26	217.90 \pm 30.25	241.10 \pm 21.10

Value data are presented as means \pm SD for normally distributed data or median (75th percentile values are in parentheses) for nonnormally distributed variables. HOMA-IR, homeostatic model assessment of insulin resistance; NEFA, nonesterified fatty acids; sTNFR2, soluble TNF α receptor 2; SAT, subcutaneous adipose tissue; VAT, visceral adipose tissue. The significance of differences is as follows: * $P < 0.05$, § $P < 0.001$, † $P = 0.01$, and ‡ $P = 0.05$ compared with lean subjects; ‡ $P = 0.006$ and $\perp P < 0.05$ compared with overweight subjects. Gene expression data are means \pm SD of paired SAT and VAT samples from the 19 lean, 28 overweight, and 15 obese subjects.

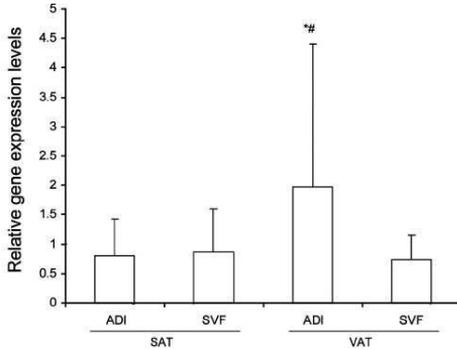


Fig. 2. PTX3 gene expression in the isolated mature adipocyte (ADI) and stromovascular fractions (SVF) of subcutaneous (SAT) and visceral adipose tissue (VAT) depots from the lean, overweight, and obese cohort. Value data are presented as means \pm SD from a group of 15 samples (8 males and 7 females) with a mean age of 59.5 ± 10 yr; 14 samples for SAT (ADI and SVF) and 13 for VAT (ADI and SVF). The significance of differences is as follows: * $P = 0.028$, between the same depot; # $P = 0.034$, between different depots.

both depots, PTX3 mRNA levels were higher in adipocytes isolated from VAT than from SAT depot.

Regulation of PTX3 gene expression and protein content in SGBS adipocytes. To explore PTX3 production in adipocytes, under conditions that occur in obesity such as upregulated proinflammatory cytokines, promoters of ROS (the oxidant H_2O_2 or the mitochondrial complex II inhibitor antimycin A), hypoxia, and insulin, we used the human preadipocyte SGBS cell line.

The mRNA levels of PTX3 were strongly upregulated by both IL-1 β (3.5-fold) and TNF α (2.8-fold) in SGBS adipocytes (Fig. 3). Small changes (<2-fold) in PTX3 transcript levels were observed in response to hypoxia (+1.2-fold), antimycin A (+1.7-fold), or H_2O_2 (-1.3-fold) treatment. Finally, IL-6 and insulin had no effect under the conditions studied here.

Since insulin may inhibit protein breakdown in adipose tissue (41), we examined whether insulin or the tested cytokines could regulate adipocyte PTX3 protein content (Fig. 4). We found that insulin did not modify PTX3 protein level relative to GAPDH protein, although a reduction tendency was observed. IL-1 β and TNF α increased PTX3 protein content relative to GAPDH protein (53 and 35%, respectively), as they did with PTX3 gene expression. IL-6 caused a smaller increment (27%) in the relative level of PTX3 protein, which does not correspond to the lack of effect on gene expression.

Then we assessed whether the upregulating effect of cytokines on PTX3 gene expression was coupled with altered PTX3 protein secretion (Fig. 5). IL-1 β exerted a strong stimulatory effect (14.6-fold) on the secretion of PTX3 protein by SGBS adipocytes, whereas the increment for TNF α was smaller (5.3-fold) in concordance with the less powerful effect observed on gene expression. IL-6 did not alter PTX3 protein secretion, although a tendency to increase was observed, which may be related to the increase in PTX3 protein content.

Correlation between PTX3 and IL-1 β gene expression in adipose tissue. Since IL-1 β powerfully induced PTX3 gene expression, protein content, and secretion in cultured adi-

pocytes, we examined the possible association between IL-1 β and PTX3 gene expression in SAT and VAT samples from cohort 2. A positive correlation between IL-1 β and PTX3 gene expression in VAT depot was observed ($r = 0.287$, $P = 0.025$), whereas no significant correlation was found in SAT depot.

DISCUSSION

PTX3 is a secreted acute-phase protein. Its plasma levels have been linked to obesity (7, 34, 44), the circulating lipid profile (34, 44, 45), atherosclerosis (33), and inflammation (27). Here, we show that in a cohort of healthy lean and overweight men, plasma PTX3 protein levels display a negative correlation with fasting triglyceride levels, a result that has been found consistently in previous studies (34, 44). Interestingly, we found a negative correlation between plasma PTX3 and insulin secretion after both intravenous and oral glucose administration. To the best of our knowledge, this is the first evidence of this association. In agreement with these results, plasma PTX3 was shown to be lower in subjects with metabolic syndrome (34, 44), a condition associated with insulin resistance. To explain decreased levels of circulating PTX3 in subjects with hypertriglyceridemia, increased compensatory hyperinsulinemia, or metabolic syndrome, two different hypotheses arise; PTX3 might constitute a factor that provides protection from developing metabolic disease, or PTX3 levels may decrease as a consequence of metabolic derangement.

We show in a second cohort composed of subjects with wide-ranging BMI that plasma PTX3 protein levels have a

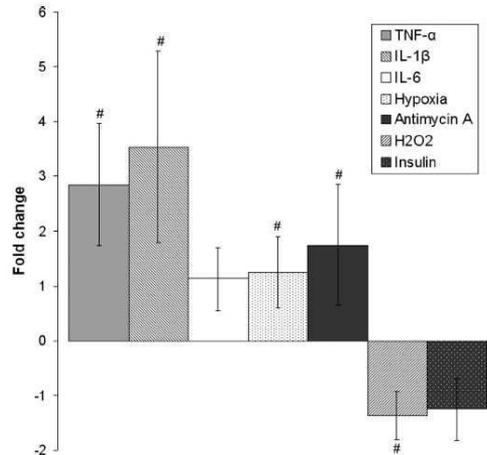


Fig. 3. Regulation of PTX3 gene expression in cultured human Simpson-Golabi-Behmel syndrome (SGBS) adipocytes. Cells were incubated for 16 h in serum-depleted DMEM without (controls) or with 20 ng/ml TNF α , 20 ng/ml IL-1 β , 10 ng/ml IL-6, hypoxia (1% O_2), 100 μ M antimycin A, 100 nM insulin, or 1 mM H_2O_2 as indicated. The mRNA levels of PTX3 were quantified relative to the reference 18S rRNA gene. Data are means \pm SD of $2^{-\Delta\Delta C_T}$ for upregulated genes and $1/2^{-\Delta\Delta C_T}$ for downregulated genes; the former are + and the latter - from 6 experiments performed in duplicate. The significance of the differences with respect to control cells is # $P < 0.001$.

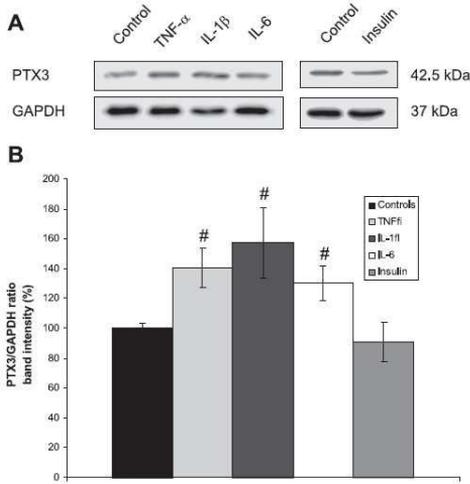


Fig. 4. Regulation of PTX3 protein content in cultured human SGBS adipocytes. Cells were incubated for 16 h in serum-depleted DMEM without (controls) or with 20 ng/ml TNF α , 20 ng/ml IL-1 β , 10 ng/ml IL-6, or 100 nM insulin as indicated. Immunoblot analyses of PTX3 and GAPDH, as loading control, were performed on cell extracts. Representative images of protein bands (A) and ratios of intensity of PTX3 bands (B) compared with intensity of GAPDH shown as means \pm SE from at least 4 samples. Bands were quantified with a LAS-300 (FujiFilm), and the MultiGauge software (FujiFilm) was used to set a background region and give a quantitative value from which the background was subtracted. The significance of the difference vs. controls is # $P < 0.05$.

significant negative correlation with obesity indexes, specifically body weight and waist circumference. These results agree with the previous reports of inverse correlation between plasma PTX3 and fat mass (7), BMI (34, 44), body weight, and waist circumference (34). They are in contrast to other studies (30, 45) that report a positive link between PTX3, obesity, and some cardiovascular risk factors; i.e., higher circulating PTX3 was found in patients with metabolic syndrome in association with subclinical atherosclerosis (45), in obese men coexisting with decreased arterial distensibility (30), and in acute myocardial infarction patients in correlation with abdominal visceral obesity (40). There is no clear explanation for these discrepancies, and all of these results come from observational studies. Unfortunately, there are no mechanistic studies to better interpret this apparently anomalous behavior of plasma PTX3 arising from different inflammatory pathologies. It is tempting to hypothesize that the multiple sources of PTX3 may serve different functions according to the tissue or the cellular component where it is produced.

Along these lines, an issue that we addressed here is the relationship between PTX3 gene expression in AT and plasma PTX3 protein in the cohort with wide-ranging BMI. We evaluated PTX3 mRNA levels in paired samples of SAT and VAT depots. We found higher PTX3 mRNA levels in the VAT depot from subjects with a BMI of >25 kg/m 2 than in lean subjects, with no differences in the SAT depot. A previous work (2) showed a tendency toward higher PTX3 gene expres-

sion in the VAT depot of obese subjects compared with normal-weight subjects. These results are in agreement with previous data from mice models, where genetically obese (*ob/ob*) and obese diabetic (*db/db*) mice show higher levels of PTX3 mRNA in white AT than their lean counterparts (1). However, PTX3 AT gene expression data do not explain lower plasma PTX3 protein levels in subjects whose BMI is >25 kg/m 2 in our cohort. This may indicate different PTX3 functions at the paracrine/autocrine levels in AT and at the systemic level in obesity. Such a finding would not be surprising, because PTX3 is expressed in different tissues and cell types. According to the BioGPS database (43), in humans PTX3 mRNA is more abundant in smooth muscle, adipocyte, cardiac myocytes, and fetal lung. PTX3 mRNA is also present in all of the different compartments of the adult human kidney (32). Further work will be necessary to ascertain the contribution of each of the high-expression PTX3 tissues to the plasma PTX3 protein levels and possible differential regulation. In addition, it should be considered that obesity is associated with increased proteolysis (21), and this could affect PTX3 protein production.

Our data highlight the importance of mature adipocytes in PTX3 production by AT, at least at the local level. We show that PTX3 mRNA is more abundant in the mature adipocyte than in the stromovascular fraction of the VAT depot, whereas no differences between fractions are observed in the SAT depot. Moreover, PTX3 mRNA levels are higher in adipocytes isolated from VAT than from SAT depots. A previous study (2) assessed PTX3 gene expression only in isolated adipocytes derived from VAT and SAT from human subjects and reported no differences between depots. Our data differ from those reported in mice, in which PTX3 mRNA levels are high and low in the stromovascular and adipocyte fractions, respectively, in mouse white and brown ATs (1).

Obesity in humans is associated with enhanced release of cytokines (14) and oxidative stress (15) and hypoxia (18) in the

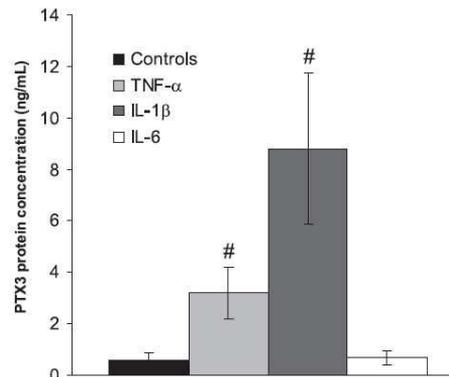


Fig. 5. Regulation of secretion of PTX3 protein by cultured human SGBS adipocytes. Cells were incubated for 16 h in serum-depleted DMEM without (controls) or with 20 ng/ml TNF α , 20 ng/ml IL-1 β , or 10 ng/ml IL-6. Conditioned media were collected at the end of the treatments, and PTX3 protein content was quantified. Means \pm SE from 2 experiments performed in quadruplicate are shown. The significance of the differences with respect to control cells is # $P < 0.005$.

AT, in parallel with hyperinsulinemia (13). Therefore, in cultured SBGS human adipocytes, we studied whether these different stimuli could regulate PTX3 production. We show that ROS promoters, such as H₂O₂ or the mitochondrial complex II inhibitor antimycin, have small (<2-fold) downregulatory and upregulatory effects, respectively, on PTX3 gene expression. Hypoxia is slightly stimulatory, whereas insulin has no effect. Regarding proinflammatory cytokines, both IL-1 β and TNF α strongly induce PTX3 gene expression, and IL-6 has no effect. In fact, a positive effect of both IL-1 and TNF α has been observed previously in a wide range of cells: endothelial (9, 20) and hepatic cells (9), fibroblasts (9, 20, 23), myoblasts (20), mononuclear phagocytes (3, 20), and renal epithelial cells (32). Furthermore, IL-1 was effective in dendritic (12) and smooth muscle cells (11) and TNF α in 3T3-F442A adipocytes (1), mononuclear phagocytes (3, 20), and lung epithelial cells (17). Similarly, IL-6 did not regulate PTX3 mRNA in endothelial, hepatic, or fibroblastic cells (9), mononuclear phagocytes (3), renal epithelial cells (32), or synovocytes (26). Then, PTX3 gene expression is consistently responsive to IL-1 β and TNF α in diverse cultured human and rodent cell types, whereas it is unresponsive to IL-6. This may be explained by the presence in the human PTX3 proximal promoter of an NF- κ B site that mediates responsiveness to IL-1 β and TNF α , whereas it does not respond to IL-6, in fibroblasts (4). We also report that IL-1 β and TNF α clearly increase adipocyte PTX3 protein content, as they do with PTX3 gene expression. IL-6 has a smaller positive effect on adipocyte PTX3 protein, not associated with enhancement of PTX3 gene expression, that may be related to its reported capacity to stimulate protein synthesis in cultured sensory neurons (29). Furthermore, we corroborate that marked upregulation of PTX3 gene expression and protein content by IL-1 β and TNF α in cultured SBGS adipocytes is parallel to increased protein secretion. Indeed, secretion of PTX3 protein from different stimulated cell types has been demonstrated, e.g., in rodent 3T3-F442A adipocytes (1), AT-derived mesenchymal stem cells (25), monocytes, endothelial cells and fibroblasts (3, 20), myoblasts (20), FS4 fibroblasts, and Hep3B hepatocytes (23). In conclusion, our data in cultured adipocytes suggest that some proinflammatory factors elevated in AT in obesity such as IL-1 β (22) and TNF α (19) may contribute to the upregulation of PTX3 production in the VAT depots of obese subjects, whereas other obesity-related factors such as AT oxidative stress and hypoxia or hyperinsulinemia do not substantially regulate PTX3 gene expression in adipocytes. In favor of this proposal, we report a positive correlation between IL-1 β and PTX3 gene expression in the VAT depot of the wide-ranging BMI cohort that constitutes evidence of the mechanism of obesity-regulated PTX3.

In summary, in this study we show a negative correlation between plasma PTX3 protein, fasting triglyceride, and insulin secretion in response to glucose in human subjects, which suggests that PTX3 is at the crossroads of metabolic disease. However, the negative association of plasma PTX3 protein with obesity indexes is concurrent with higher PTX3 gene expression in VAT depots. Some proinflammatory factors upregulated in obesity, such as IL-1 β , constitute possible stimulating factors of adipocyte PTX3 production. Finally, upregulation of VAT PTX3 in obesity may participate in the local AT equilibrium between inflammatory and anti-inflammatory response.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank to Dr. Martin Wabitsch (University of Ulm, Germany) for kindly providing us with the SBGS cell line. We also thank the Hospital Joan XXIII Biobank for the facilities for obtaining the samples from the AT collection.

GRANTS

This study was supported by the following grants: SAF2009-07559 from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (MCI); PI 08/0733, PI08/1195, Ciber de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CB07/08/0012; StemOb project), and CIBERObn de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CB06/03/010) from the Instituto de Salud Carlos III; and 2009SGR1257, Grup de Recerca Consolidat from l'AGAUR, Spain. O. Osorio-Conles was the recipient of a Formación de Personal Investigador fellowship from the MCI. M. R. Chacón is supported by a fellowship from the Fondo de Investigación Sanitaria CP06/00119.

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

REFERENCES

- Abderrahim-Ferkoune A, Bezy O, Chieffini C, Maffei M, Grimaldi P, Bonino F, Moustaid-Moussa N, Pasqualini F, Mantovani A, Ailhaud G, Anri E. Characterization of the long pentraxin PTX3 as a TNF α -induced secreted protein of adipose cells. *J Lipid Res* 44: 994–1000, 2003.
- Alberti L, Gilardini L, Zullian A, Micheletto G, Peri G, Doni A, Mantovani A, Invernizzi C. Expression of long pentraxin PTX3 in human adipose tissue and its relation with cardiovascular risk factors. *Atherosclerosis* 202: 455–460, 2009.
- Alles V, Bottazzi B, Peri G, Golay J, Introna M, Mantovani A. Inducible expression of PTX3, a new member of the pentraxin family, in human mononuclear phagocytes. *Blood* 84: 3483–3493, 1994.
- Basile A, Sica A, d'Aniello E, Breviario F, Garrido G, Castellano M, Mantovani A, Introna M. Characterization of the promoter for the human long pentraxin PTX3. Role of NF- κ B in tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β regulation. *J Biol Chem* 272: 8172–8178, 1997.
- Bastard J, Maachi M, Lagathu C, Kim M, Caron M, Vidal H, Capeau J, Feve B. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw* 17: 4–12, 2006.
- Bergman R, Prager R, Volund A, Olefsky J. Equivalence of the insulin sensitivity index in man derived by the minimal model method and the euglycemic glucose clamp. *J Clin Invest* 79: 790–800, 1987.
- Bosutti A, Malaponte G, Zanetti M, Castellino P, Heer M, Guarnieri G, Biolo G. Calorie restriction modulates inactivity-induced changes in the inflammatory markers C-reactive protein and pentraxin-3. *J Clin Endocrinol Metab* 93: 3226–3229, 2008.
- Bottazzi B, Doni A, Garlanda C, Mantovani A. An integrated view of humoral innate immunity: pentraxins as a paradigm. *Annu Rev Immunol* 28: 157–183, 2010.
- Breviario F, d'Aniello E, Golay J, Peri G, Bottazzi B, Bairoch A, Saccone S, Marzella R, Predazzi V, Rocchi M. Interleukin-1-inducible genes in endothelial cells. Cloning of a new gene related to C-reactive protein and serum amyloid P component. *J Biol Chem* 267: 22190–22197, 1992.
- Chacón M, Miranda M, Jensen C, Fernández-Real J, Vilarrasa N, Gutiérrez C, Naf S, Gomez J, Vendrell J. Human serum levels of fetal antigen 1 (FAI/Dlk1) increase with obesity, are negatively associated with insulin sensitivity and modulate inflammation in vitro. *Int J Obes (Lond)* 32: 1122–1129, 2008.
- Chevillard G, Derjuga A, Devost D, Zingg H, Blank V. Identification of interleukin-1 β regulated genes in uterine smooth muscle cells. *Reproduction* 134: 811–822, 2007.
- Doni A, Michela M, Bottazzi B, Peri G, Valentini S, Polentarutti N, Garlanda C, Mantovani A. Regulation of PTX3, a key component of humoral innate immunity in human dendritic cells: stimulation by IL-10 and inhibition by IFN- γ . *J Leukoc Biol* 79: 797–802, 2006.
- Duvnjak L, Duvnjak M. The metabolic syndrome - an ongoing story. *J Physiol Pharmacol* 60, Suppl 7: 19–24, 2009.
- Fain J. Release of interleukins and other inflammatory cytokines by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily due to the nonfat cells. *Vitam Horm* 74: 443–477, 2006.

15. 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.
16. Garlanda C, Bottazzi B, Bastone A, Mantovani A. Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility. *Annu Rev Immunol* 23: 337–366, 2005.
17. Han B, Mura M, Andrade C, Okutani D, Lodyga M, dos Santos C, Keshavjee S, Matthay M, Liu M. TNFalpha-induced long pentraxin PTX3 expression in human lung epithelial cells via JNK. *J Immunol* 175: 8303–8311, 2005.
18. 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.
19. Hotamisligil G, Arner P, Caro J, Atkinson R, Spiegelman B. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 95: 2409–2415, 1995.
20. Introna M, Alles V, Castellano M, Picardi G, De Gioia L, Bottazzoli B, Peri G, Breviaro F, Salmons M, De Gregorio L, Dragani T, Srinivasan N, Blundell T, Hamilton T, Mantovani A. Cloning of mouse ptx3, a new member of the pentraxin gene family expressed at extrahepatic sites. *Blood* 87: 1862–1872, 1996.
21. Jensen MD, Heymond MW. Protein metabolism in obesity: effects of body fat distribution and hyperinsulinemia on leucine turnover. *Am J Clin Nutr* 53: 172–176, 1991.
22. Juge-Aubry C, Somm E, Chicheportiche R, Burger D, Pernin A, Cuénod-Pittet B, Quinodoz P, Giusti V, Dayer J, Meier C. Regulatory effects of interleukin (IL)-1, interferon- β , and IL-4 on the production of IL-1 receptor antagonist by human adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 2652–2658, 2004.
23. Lee G, Goodman A, Lee T, Vilecek J. Relationship of TSG-14 protein to the pentraxin family of major acute phase proteins. *J Immunol* 153: 3700–3707, 1994.
24. Lee G, Lee T, Vilecek J. TSG-14, a tumor necrosis factor- and IL-1-inducible protein, is a novel member of the pentraxin family of acute phase proteins. *J Immunol* 150: 1804–1812, 1993.
25. Lee MJ, Kim J, Kim MY, Bae YS, Ryu SH, Lee TG, Kim JH. Proteomic analysis of tumor necrosis factor- α -induced secretome of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *J Proteome Res* 9: 1754–1762, 2010.
26. Luchetti M, Piccinini G, Mantovani A, Peri G, Matteucci C, Pomponio G, Fratini M, Fraticelli P, Sambo P, Di Loreto C, Doni A, Introna M, Gabrielli A. Expression and production of the long pentraxin PTX3 in rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol* 119: 196–202, 2000.
27. Mantovani A, Garlanda C, Doni A, Bottazzi B. Pentraxins in innate immunity: from C-reactive protein to the long pentraxin PTX3. *J Clin Immunol* 28: 1–13, 2008.
28. Matthews D, Hosker J, Rudenski A, Naylor B, Treacher D, Turner R. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28: 412–419, 1985.
29. Melemedjian OK, Asiedu MN, Tihlu DV, Peebles KA, Yan J, Ertz N, Dussor GO, Price TJ. IL-6- and NGF-induced rapid control of protein synthesis and nociceptive plasticity via convergent signaling to the eIF4F complex. *J Neurosci* 30: 15113–15123, 2010.
30. Miyaki A, Maeda S, Yoshizawa M, Misono M, Sasai H, Shimojo N, Tanaka K, Ajisaka R. Is pentraxin 3 involved in obesity-induced decrease in arterial distensibility? *J Atheroscler Thromb* 17: 278–284, 2010.
31. Moreno-Navarrete JM, Martínez-Barricarte R, Catalán V, Sabater M, Gómez-Ambrosi J, Ortega FJ, Ricart W, Blüher M, Frühbeck G, Rodríguez de Cordoba S, Fernández-Real JM. Complement factor H is expressed in adipose tissue in association with insulin resistance. *Diabetes* 59: 200–209, 2010.
32. Nauta A, de Haij S, Bottazzi B, Mantovani A, Borrias M, Aten J, Rastaldi M, Daba M, van Kooten C, Roos A. Human renal epithelial cells produce the long pentraxin PTX3. *Kidney Int* 67: 543–553, 2005.
33. Norata G, Garlanda C, Catapano A. The long pentraxin PTX3: a modulator of the immunoinflammatory response in atherosclerosis and cardiovascular diseases. *Trends Cardiovasc Med* 20: 35–40, 2010.
34. Ogawa T, Kawano Y, Imamura T, Kawakita K, Sagara M, Matsuo T, Kakitsubata Y, Ishikawa T, Kitamura K, Hatakeyama K, Asada Y, Kodama T. Reciprocal contribution of pentraxin 3 and C-reactive protein to obesity and metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring)* 18: 1871–1874, 2010.
35. Pepys M, Hirschfield G. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest* 111: 1805–1812, 2003.
36. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30: e36, 2002.
37. Raymond F, Métairon S, Kussmann M, Colomer J, Nascimento A, Mormeneo E, García-Martínez C, Gómez-Foix AM. Comparative gene expression profiling between human cultured myotubes and skeletal muscle tissue. *BMC Genomics* 11: 125, 2010.
38. Shah A, Mehta N, Reilly M. Adipose inflammation, insulin resistance, and cardiovascular disease. *J Parenter Enteral Nutr* 32: 638–644, 2008.
39. Shim BJ, Jeon HK, Lee SJ, Kim SS, Park MY, Lee DH, Shin WS, Lee JM, Youn HJ, Chung WS, Seung KB. The Relationship Between Serum Pentraxin 3 and Central Obesity in ST-Segment Elevation Myocardial Infarction Patients. *Korean Circ J* 40: 308–313, 2010.
40. Tischler ME, Ost AH, Spina B, Cook PH, Coffman J. Regulation of protein turnover by glucose, insulin, and amino acids in adipose tissue. *Am J Physiol Cell Physiol* 247: C228–C233, 1984.
41. Wabitsch M, Brenner R, Melzner I, Braun M, Möller P, Heinze E, Debatin K, 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.
42. World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser* 894: i–xii, 1–253, 2000.
43. Wu C, Orozco C, Boyer J, Leglise M, Goodale J, Batalov S, Hodges CL, Haase J, James J, Huss JW 3rd, Su AI. BioGPS: an extensible and customizable portal for querying and organizing gene annotation resources. *Genome Biol* 10: R130, 2009.
44. Yamasaki K, Kurimura M, Kasai T, Sagara M, Kodama T, Inoue K. Determination of physiological plasma pentraxin 3 (PTX3) levels in healthy populations. *Clin Chem Lab Med* 47: 471–477, 2009.
45. Zanetti M, Bosutti A, Ferreira C, Vinci P, Biolo G, Fonda M, Valente M, Cattin L, Guarneri G, Barazzoni R. Circulating pentraxin 3 levels are higher in metabolic syndrome with subclinical atherosclerosis: evidence for association with atherogenic lipid profile. *Clin Exp Med* 9: 243–248, 2009.

PUBLICACIÓN 2

Adipose Tissue and Plasma CCDC80 Protein in Relation to Human Obesity

Osorio-Conles O, Guitart M, Moreno-Navarrete JM, Escoté X, Sonia
Fernández-Veledo S, Duran X, Fernandez-Real JM, Vendrell J, and Gómez-
Foix AM

RESUMEN

La proteína CCDC80 en el tejido adiposo y en plasma en relación con la obesidad humana

La proteína CCDC80 (*coiled-coil domain containing 80*) es secretada por los adipocitos y regula la homeostasis energética en ratones DIO. Su relación con la obesidad y el significado de los niveles plasmáticos de CCDC80 en humanos todavía se desconocen. En este trabajo hemos analizado el contenido proteico en CCDC80 en VAT y SAT, así como sus niveles plasmáticos en relación a la obesidad y complicaciones asociadas en humanos. Se emplearon muestras pareadas de VAT y SAT de individuos delgados y obesos, y la línea de preadipocitos humanos SGBS. Los niveles plasmáticos de CCDC80 fueron analizados en dos cohortes: una de compuesta por individuos con distinto grado de obesidad (n= 48, BMI 20 to 40 kg/m²) y una segunda compuesta por individuos obesos mórbidos (n=32, BMI 35 to 60 kg/m²). El contenido proteico en CCDC80 en el tejido adiposo y adipocitos SGBS cultivados se realizó mediante *immunoblot*. La cuantificación de los niveles plasmáticos de CCDC80 se realizó mediante ELISA.

El contenido proteico en CCDC80 resultó ser aproximadamente un 60% menor en el depósito de VAT que en de SAT en individuos normales. Se encontró marcadamente incrementado en el VAT, mientras que en el SAT no varió, en los individuos obesos respecto a los delgados. Los niveles plasmáticos de CCDC80 variaron entre 0,24 y 9,1 ng/ml en ambas cohortes combinadas. En la cohorte con distintos grados de obesidad, los niveles plasmáticos correlacionaron negativamente con la secreción de insulina y los niveles de glucosa tras el test de tolerancia oral a la glucosa, y positivamente con el recuento de neutrófilos sanguíneos y los niveles de MCP-1 circulantes, mientras que no se encontraron asociaciones con el BMI, la sensibilidad a insulina o la edad. En la cohorte de obesos mórbidos se encontraron asociaciones con el grado de esteatosis hepática, los niveles circulantes de CRP y el espesor íntima-media carotídeo, pero no con el BMI o la edad. Así, la proteína CCDC80 forma parte de los componentes sobreexpresados en el tejido adiposo visceral en obesidad. Sus niveles circulantes

están asociados con una mejora en la tolerancia a la glucosa pero también con marcadores inflamatorios, independientemente de la obesidad. En la obesidad mórbida, se asocian con un desajuste del perfil metabólico, incluyendo también inflamación, hígado graso y enfermedad vascular. En conclusión, CCDC80 puede ser uno de los factores del secretoma alterado en la obesidad en el tejido adiposo y puede relacionarse con cambios metabólicos en otros órganos, podría contribuir a mejorar la captación de glucosa y su sobreexpresión se debe al perfil inflamatorio asociado a la obesidad más que a la obesidad en sí misma, pudiendo ser un componente patogénico o de comorbilidad en estas enfermedades.

Tipo de artículo: *Research article* Pendiente de publicación.

Factor de impacto: -

Participación del autor:

Obtención de cultivos celulares SGBS.

Extracción de muestras de tejidos.

Extracción de RNA y determinación de los niveles de expresión génica mediante RT-PCR.

Extracción de proteína y cuantificación de proteína mediante *immunoblotting*.

Determinación de los niveles plasmáticos mediante ELISA.

Participación en la redacción de la Introducción, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión del artículo.

Adipose tissue and plasma CCDC80 protein in relation to human obesity

O. Osorio-Conles^{1,2}, M. Guitart², J.M. Moreno-Navarrete³, X. Escoté^{1,4}, S. Fernández-Veledo^{1,4}, X. Duran^{1,4}, J.M. Fernandez-Real³, J. Vendrell^{1,4}, and A. M. Gómez-Foix^{1,2}

¹ CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM)-Instituto de Salud Carlos III, Spain. ² Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain. ³ Service of Diabetes, Endocrinology and Nutrition, Institut d'Investigació Biomèdica de Girona and CIBERobn, Girona, Spain. ⁴ Joan XXIII University Hospital, Rovira i Virgili University IISPV, Tarragona, Spain.

Running title: CCDC80 protein in relation to human obesity

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest

ABSTRACT

Background: Coiled-coil domain-containing 80 (CCDC80) is an adipocyte-secreted protein that regulates energy homeostasis in diet-induced obesity in mice. However, its link to obesity and the significance of plasma CCDC80 in humans remains unknown. We analysed CCDC80 protein in visceral (VAT) and subcutaneous (SAT) adipose tissue and plasma levels in relation to obesity and obesity-related complications in humans.

Subjects and Methods: We used paired VAT and SAT human samples and the human preadipocyte cell line SGBS. Plasma CCDC80 protein levels were analysed in two cohorts: cohort-1, consisting of lean and obese subjects ($n = 48$, BMI range 20 to 40 kg/m^2), and cohort-2, composed of morbidly obese patients ($n = 32$, BMI range 35 to 60 kg/m^2). We used immunoblotting to analyse adipose tissue and SGBS cell CCDC80 protein, and ELISA to quantify CCDC80 protein in plasma samples.

Results: In lean subjects, total CCDC80 protein content was lower in visceral fat compared with SAT depots. In obese patients, CCDC80 was markedly increased in VAT ($p < 0.05$), but equivalent in SAT, when compared with lean counterparts. Plasma CCDC80 protein levels ranged from 0.24 to 9.1 ng/ml in cohort-1 and -2 combined. In cohort-1, CCDC80 correlated negatively with insulin secretion during the oral glucose tolerance test and positively with inflammatory parameters, such as blood neutrophil count and circulating monocyte chemoattractant protein-1 levels. In cohort-2, circulating CCDC80 levels were positively linked to inflammatory biomarkers (C-reactive protein). Interestingly, CCDC80 was also linked to chronic low-grade associated complications, such as atherosclerosis (carotid intima-media thickness, $r = 0.62$, $p < 0.001$) and hepatic steatosis (ANOVA $p = 0.025$).

Conclusions: CCDC80 protein is one of the components upregulated in visceral adipose tissue in obesity. Circulating CCDC80 protein levels were associated both with impaired insulin secretion and inflammatory markers, independently of obesity; and in morbid obesity, were linked to chronic inflammation-associated complications, such as fatty liver and vascular disease.

Keywords: adipokine, Ccdc80/URB/SSG1/DRO1.

INTRODUCTION

Adipokines are bioactive polypeptides secreted by white adipose tissue, either adipocytes or adipose tissue immune cells (1). In obesity, the adipokine profile changes in response to the amount or condition of the adipose organ (2). Altered adipokine secretion is considered to contribute to the development of obesity-related disorders, such as insulin resistance (3), cardiovascular disease (4) or hepatic steatosis (5).

The CCDC80/URB/SSG1/DRO1 gene has been identified in different scenarios and several aliases have been used for its description. It is an obesity-related gene, as URB was identified as being upregulated in brown adipose tissue of bombesin receptor subtype-3-deficient mice, a mouse model of mild late-onset obesity (6). Conversely, however, a downregulation of this gene was detected in white adipose tissue of obese mouse models, including *ob/ob*, KKAY and diet-induced obese mice (7). It has been cloned as a 17 β -estradiol regulated gene in rat uterus, and named steroid-sensitive gene-1 (SSG1) (8); and has been identified as a downregulated transcript in rat RK3E epithelial cells transformed by several oncogenes and has thus been named DRO1 (downregulated by oncogenes 1) (9).

The CCDC80 gene is predominantly expressed at the mRNA level in white adipose tissue in humans and mice (7, 10). It is also expressed in preadipocytes and adipocytes of both primary cultured human cells (7) and mouse 3T3L1 cells (10). In 3T3L1 cells, *Ccdc80* mRNA levels are transiently downregulated during the differentiation process (7, 10). In these mature adipocytes, *Ccdc80* is repressed by insulin, TNF- α , H₂O₂ and hypoxia (7); and by dexamethasone and 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) in confluent preadipocytes (10). The *Ccdc80* gene has been shown to play a dual role in

adipogenesis *in vitro* through mechanisms that involve Wnt/ β catenin signalling, C/EBP α and PPAR γ (10). However, Ccdc80 gene deletion does not affect normal white adipose tissue development in mice (11).

The Ccdc80 rodent protein (6) and the human protein (12) bear a signal peptide, indicating that this is a secreted protein. In fact, secretion of the protein has been demonstrated from differentiated 3T3L1 adipocytes (10) and primary cultured human adipocytes (7). Furthermore, the protein has been localised in the extracellular matrix, in cartilage of the developing skeleton in mouse embryos (12) and pericellularly in cultured 293T cells engineered to express a GFP-tagged protein (13).

The physiological role of the Ccdc80 gene has been highlighted in mice in which the gene is disrupted (11). These mice exhibit increased sensitivity to high-fat diet-induced glucose intolerance and reduced glucose-stimulated insulin secretion. Furthermore, some circadian clock genes are simultaneously regulated in white adipose tissue, skeletal muscle and pancreas. Thus, this gene is a novel modulator of glucose and energy homeostasis during diet-induced obesity.

In summary, even though Ccdc80 has been considered an adipokine and is known to have altered expression in obese mice models and a metabolic control role in diet-induced obese mice, the role of CCDC80 in relation to human obesity has not been investigated. Thus, we analysed CCDC80 protein content in VAT and SAT depots in relation to obesity in humans. In addition, we tested whether circulating CCDC80 protein levels in humans are linked to obesity-related diseases.

MATERIALS AND METHODS

Selection of study participants, blood parameters and other analytical methods

Adipose tissue samples were obtained from a biobank collection held at the University Hospital Joan XXIII (Tarragona, Spain). Subjects were categorised by body mass index (BMI) and classified as lean ($\text{BMI} < 25 \text{ Kg/m}^2$) or obese ($\text{BMI} \geq 30 \text{ Kg/m}^2$), according to (14). We used paired VAT and SAT samples from 10 patients (4 males and 6 females with ages ranging between 35 and 70 years old): 5 lean ($\text{BMI} 22.4$ to 24.9 Kg/m^2) and 5 obese ($\text{BMI} 30$ to 38.8 Kg/m^2) participants. All subjects were Caucasian, reported steady body weight for at least 3 months prior to the study, were free of any infections in the month preceding the study, were scheduled for an elective surgical procedure (cholecystectomy or surgery for abdominal hernia); and had no metabolic diseases other than obesity. Exclusion criteria were: presence of liver or renal diseases, malignancy, chronic inflammatory disease and pharmacological treatments that could alter the lipid profile. All patients had fasted overnight for at least 12 h prior to the surgical procedure. VAT and SAT samples were obtained during the surgical procedure, washed in PBS, immediately frozen in liquid N_2 and stored at -80°C . The Hospitals' ethics committee approved the study and informed consent for biobanking was obtained from all participants.

Two cohorts selected by the "Hospital de Girona Dr. Josep Trueta" (Girona, Spain) were included in the study. Cohort-1 was composed of subjects with a different degree of obesity ($n= 48$, BMI range: $20 - 40 \text{ kg/m}^2$). Insulin sensitivity and insulin secretion was studied using the minimal model approach. Insulin sensitivity (Si) was measured using the frequently sampled intravenous (FSIV) glucose tolerance test with minimal

model analysis (15). Insulin secretion was calculated from the FSIV glucose tolerance test as the incremental insulin response from 0–10 min (acute insulin response to glucose, AIRg). The time courses of serum glucose and insulin over 3 h were analysed using the Minimal Model Program to calculate the S_i index (16). On another day, an oral glucose tolerance test (OGTT) was performed following the American Diabetes Association recommendations. After a 12-h overnight fast, 75 g of glucose was ingested and blood samples were collected through a catheter from an antecubital vein at 0, 30, 60, 90, and 120 min for serum glucose and insulin measurement. Serum free insulin-like growth factor 1 (IGF-1) was measured by immunoradiometric assay (Diagnostic Systems Laboratories, Webster, USA), (assay sensitivity 0.80 g/l and intra- and inter-assay coefficient of variation (CV) 9 and 11%, respectively). Plasma soluble monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) levels were measured by hMCP-1 Biotrak ELISA (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK), (assay sensitivity <10 pg/ml and CV <10%). Leukocyte, monocyte and neutrophil counts (EDTA sample; Coulter Electronics, Hialeah, USA) were determined by routine laboratory tests.

Cohort-2 was composed of morbidly obese subjects (n=32, BMI range: 35 - 60 kg/m²). Plasma samples were obtained from morbidly obese subjects recruited from the ongoing multicentre FLORINASH Project. Inclusion criteria were: aged from 30 to 65 years old, BMI > 35 kg/m² and ability to understand study procedures. Exclusion criteria were: systemic diseases, infection in the previous month, serious chronic illness, > 20 g ethanol intake/day or use of medications that might interfere with insulin action. Furthermore, liver disease (specifically, tumoral disease and HCV infection) and thyroid dysfunction were specifically excluded by biochemical work-up. The institutional review board approved the study protocol and all subjects gave their written informed consent after the nature and potential risks of the study had been

explained to them. Si was measured using a hyperinsulinemic-euglycemic clamp, previously reported elsewhere (17). To measure carotid atherosclerosis, we used a Siemens Acuson S2000 (Mochida Siemens Medical System, Tokyo, Japan) ultrasound system with a 3.5 MHz convex transducer to scan the liver and a 7.5 mHz linear array transducer to scan carotid arteries. Images were transferred to Starviewer software, developed in our laboratory (<http://gilab.udg.edu>), and independently evaluated by two radiologists blinded to clinical and laboratory data. Carotid arteries were evaluated according to the Mannheim Consensus (18). To measure liver steatosis, liver biopsies were analysed by a single pathologist expert in hepatic pathology. Hematoxylin and eosin, Masson's trichrome and reticulin stains were performed on each liver sample. Histological features of steatosis, lobular inflammation, hepatocellular ballooning and fibrosis were scored using the NAFLD scoring system (19). Steatosis was graded 0 - 3 (0 is < 5%; 1 is 5 - 33%, 2 is 33 - 66%, 3 is > 66%), lobular inflammation was graded 0 - 3 based on inflammatory foci per 20X with a 20X ocular lens (0 is none, 1 is < 2 foci, 2 is 2 - 4 foci, 3 is > 4 foci) and hepatocellular ballooning was graded 0 - 2 (0 is none, 1 is few ballooning cells, 2 is prominent ballooning). The features were combined to assess the NAFLD activity score (NAS), going from 0 to 8. $NAS \geq 5$ were diagnosed as non-alcoholic steatohepatitis, $NAS = 0 - 2$ were considered non-diagnostic of steatohepatitis and $NAS = 3 - 4$ were considered indeterminate. Fibrosis was graded 1 - 4 and was not included in the activity score.

SGBS cell culture

The human preadipocyte cell line SGBS of subcutaneous origin (20) was kindly provided by Dr. Martin Wabitsch (University of Ulm, Germany). Confluent

preadipocytes were grown in DMEM/F-12 media supplemented with 33 μ M biotin and 17 μ M pantothenate plus 10% FBS. Confluent SGBS preadipocytes (day 0) were induced to differentiate to adipocytes using DMEM/F-12 media supplemented with 33 μ M biotin, 17 μ M pantothenate, 0.01 mg/ml transferrin, 20 nM insulin, 0.1 μ M cortisol, 0.2 nM triiodothyronine, 0.5 mM IBMX, 2 μ M rosiglitazone and 25 nM dexamethasone for 4 days and then the same medium devoid of IBMX, rosiglitazone and dexamethasone for a maximum of 10 more days (day 14). Cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. To analyse secreted proteins, serum-free media conditioned for 48 h were collected, filtered (0.22 μ m) to remove cells and debris, and stored at -20°C. Cell monolayers were rinsed in PBS, frozen in liquid N₂ and stored at -80°C.

CCDC80 protein and mRNA

Secreted CCDC80 protein was measured in 100 μ l of plasma or SGBS cell-conditioned medium samples by ELISA for human CCDC80 (Cusabio, Wuhan, P.R. China), with a 0.078 ng/ml limit of detection, and an intra- and inter-assay CV of < 8% and < 10%, respectively.

Tissue and cell CCDC80 protein was analysed by immunoblotting. Frozen tissue samples were powdered on dry ice and homogenised in buffer composed of 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1mM EGTA, 1% Triton X-100, 20 mM sodium pyrophosphate, 25 mM NaF, 1 mM beta-glycerophosphate, 1 mM Na₃VO₄ and 2 mg/ml leupeptin. SGBS cells were homogenised as described in (21). Lysates were gently shaken for 60 min at 4°C, centrifuged at 2500g for 10 min at 4°C and then

supernatants were harvested and stored at -80°C until analysis. Protein was resolved in 8.5% SDS-PAGE. Antibodies against CCDC80 (R&D Systems Antibodies, Minneapolis, USA), fumarylacetoacetase (Santa Cruz, Dallas, USA) and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (Cell Signaling, Beverly, USA) were used. Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies were used and membranes were developed with ECL-Plus (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Protein bands were detected and quantified using a LAS-3000 luminescent image analyser (FujiFilm, Tokyo, Japan).

Total RNA was extracted from SGBS cells as described in (21). RNA was retro-transcribed with TaqMan reagents from Applied Biosystems (Carlsbad, USA), using random hexamers and RNase inhibitor. Real-time PCR was performed in a LightCycler 480 with LightCycler 480 Probes Master (Roche Applied Science, Sant Cugat del Valles, Spain). Probes for 18S rRNA and CCDC80 from Applied Biosystems were used. The 18S rRNA gene was used as the control to normalise the crossing point (CP). Gene expression levels were estimated by $2^{-\Delta CP}$.

Statistical analysis

We used the SPSS/PC+ statistical package (version 16; SPSS, Chicago, USA). For clinical and anthropometrical variables, normally distributed data were expressed as mean values \pm SD or \pm SEM, and for variables with a non-Gaussian distribution, values were expressed as the median (25th and 75th percentile). For statistical analysis of expression variables, values that did not have a Gaussian distribution were logarithmically transformed or analysed by non-parametric tests. Comparisons between groups were performed by one-way ANOVA with a post-hoc Bonferroni correction or

by a Kruskal-Wallis non-parametric test when appropriate. Associations between quantitative variables were evaluated by Pearson correlation analysis or Spearman correlation for non-normally distributed variables. The independence of the associations was evaluated by linear regression analysis. Statistical significance occurred if a computed two-tailed probability value was < 0.05 .

For adipose tissue and cultured cell gene expression experiments, a general linear model repeated-measures test was used for the statistical analysis and a two-tailed probability value < 0.05 was considered as statistically significant.

RESULTS

CCDC80 protein levels in adipose tissue depots in relation to obesity

CCDC80 protein was analysed by immunoblotting in paired samples of VAT and SAT depots from a cohort of lean and obese subjects, relative to the levels of fumarylacetoacetase (FAA) (Figure 1). FAA was used as a control gene since it displays equivalent content between omental and subcutaneous human adipose tissue and is not regulated by obesity in omental depots (22). In samples from lean subjects, CCDC80 protein appeared as a major band of about 108 kDa, which is concordant with the molecular mass of the human CCDC80 encoded protein, predicted and confirmed by *in vitro* transcription-translation (12). We observed a low proportion of bands corresponding to lower molecular mass forms (within 95 and 50 kDa), which are reported to form as CCDC80 proteolytic fragments generated by a cell-surface anchored or extracellular protease (10). Minority bands of higher molecular mass (150 kDa) were observed (data not shown), which according to previous data (9, 12) would be due to N-linked glycosylation of the protein. In lean subjects, relative CCDC80 protein content (including all bands within 50 and 108 kDa) was about 60% lower in VAT than in SAT.

In adipose tissue samples from obese subjects, an increased proportion of low molecular mass forms (within 50 and 75 kDa) was observed, suggesting enhanced proteolysis. No change in higher molecular mass forms (150 kDa) content was detected (data not shown). Total CCDC80 protein (108 to 50 kDa) content was not significantly altered in SAT from the obese compared to lean subjects. However, in VAT depots from obese subjects, CCDC80 protein levels were 3.9-fold higher than those in their lean

counterparts. Therefore, obesity was associated with a marked increase in CCDC80 protein content in VAT depots, but no change in SAT depots.

CCDC80 intracellular protein and secretion in human SGBS adipocytes

We also analysed SGBS intracellular CCDC80 protein in confluent preadipocytes and differentiating and mature adipocytes (Figure 2A). In SGBS cells at all stages of differentiation, a major band of about 108 kDa corresponding to the full length protein was observed, as well as bands of lower molecular weights up to about 75 kDa. However, in these cells, abundant forms of higher molecular mass (150 kDa) were detected, which suggests extensive glycosylation of the protein. Quantification of CCDC80 protein levels (including all molecular mass forms) relative to the control protein GAPDH revealed that differentiating adipocytes already displayed markedly lower levels than confluent preadipocytes at just 1 day post-differentiation induction, with a minimal content at 6 days post-differentiation (Figure 2A). Thereafter, the CCDC80 protein content increased and the highest values were observed in mature adipocytes. A similar pattern has been observed for *Ccdc80* mRNA in mouse 3T3L1 adipocytes, namely a reduction in expression in the early stages of cell differentiation, which was attributed to the combination of adipogenic inducers dexamethasone and IBMX (10). Differentiation of SGBS cells was induced initially by addition of the adipogenic factors transferrin, insulin, cortisol, triiodothyronine, dexamethasone, IBMX and rosiglitazone for 4 days, whereas for the following 10 additional days, dexamethasone, IBMX and rosiglitazone were withdrawn. Thus, we then tested whether the combination of these adipogenic factors could have a repressor effect. We found that treatment of confluent SGBS preadipocytes for 16 h with dexamethasone plus IBMX and rosiglitazone reduced CCDC80 protein content (Figure 2B), indicating that

these factors may contribute to the reduction that follows induction of SGBS preadipocyte differentiation. However, we cannot rule out the possibility that the maturation process also participates in this effect.

We examined whether changes in SGBS cell CCDC80 protein content during the differentiation process were due to alterations in mRNA levels. As shown in Figure 2C, the mRNA levels of CCDC80 tended to be reduced after differentiation induction and were notably higher in mature adipocytes, compared with confluent preadipocytes, thus resembling protein level changes.

Secretion of the CCDC80 protein has previously been demonstrated in differentiated 3T3L1 adipocytes (10) and primary cultured human adipocytes (7). We used ELISA to quantify CCDC80 protein in serum-free conditioned media from differentiating and mature SGBS adipocytes (Figure 2D). We observed that there was a trend during the initial stages of differentiation towards a decrease in the amount of CCDC80 protein secreted to the media, consistent with the observed reduction in intracellular protein. However, in conditioned media from mature adipocytes, CCDC80 protein levels were further decreased in contrast to the higher intracellular levels, thus suggesting lessened secretion with respect to differentiating adipocytes. The range of values of CCDC80 protein in conditioned media was 0.45 to 3.3 ng/ml.

Circulating CCDC80 protein levels in human subjects: relationship to obesity

CCDC80 protein concentrations in plasma were measured by ELISA in a cohort of subjects with different degrees of obesity (cohort-1) in relation to clinical data on insulin secretion and sensitivity. The median of the values within this cohort was $0.90 \pm$

0.47 ng/ml. Plasma CCDC80 levels correlated negatively with insulin secretion during the glucose tolerance test (Figure 3A). CCDC80 was not significantly associated with BMI, insulin sensitivity or age ($p > 0.2$). Interestingly, a negative correlation was found between CCDC80 and circulating free IGF-1 levels (Figure 3B), known to be higher in obese than control subjects (23, 24). We also examined the relationship of circulating CCDC80 to parameters of inflammation, and found a positive association with blood neutrophil count (Figure 3C) and MCP-1 (Figure 3D).

Circulating CCDC80 protein levels were also assessed in a cohort of morbidly obese patients (cohort-2) in relation to obesity-associated diseases and inflammation. There was an association between CCDC80 levels and the degree of hepatic steatosis (ANOVA $p = 0.025$) (Figure 4A). A correlation was also found between CCDC80 and the liver inflammatory marker C-reactive protein ($r = 0.46$ and $p = 0.009$, $n = 31$). Moreover, a positive correlation was found between CCDC80 and carotid intima-media thickness (Figure 4B, $r = 0.62$, $p < 0.001$). Again, CCDC80 was not significantly associated with BMI or age ($p > 0.2$).

DISCUSSION

The dynamics of extracellular matrix proteins has emerged as an important player in proper adipocyte homeostasis and is regulated by several processes, including energy metabolism and insulin. Here we describe for the first time a differential pattern of the human secretable CCDC80 protein regarding the origin of adipose tissue and marked changes in obese subjects, for instance in visceral fat. Moreover, we show that circulating CCDC80 protein levels are associated with impaired insulin secretion, inflammatory markers, fatty liver disease and atherosclerosis.

The human CCDC80 gene is predominantly expressed in white adipose tissue in humans at the mRNA level (7, 10), but its protein pattern, potential divergence in VAT and SAT content and regulation by obesity have not previously been determined. SAT and VAT are known to vary in their structural, functional and molecular properties (25), and obesity can also differentially regulate the abundance of particular proteins in either depot (26). In this study, immunoblotting analysis of CCDC80 protein in adipose depots from lean subjects demonstrated lower levels in VAT than SAT and the predominance of a CCDC80 molecular form corresponding to the full length protein. In adipose depots from obese subjects, we detected an increased proportion of small molecular forms, which have been reported to originate as cleavage fragments generated by extracellular proteolytic activity (10), but whose biological activity remains to be defined. Our observation is in agreement with the notion of enhanced extracellular matrix remodelling in obesity (27). In obese compared to lean subjects, the total CCDC80 protein content was greatly increased in VAT depots, but unaltered in SAT depots. Therefore, the CCDC80 protein displays adipose tissue depot

differences and obesity-related upregulation in humans. The latter differs from data on rodent models of obesity at the mRNA level. *Ccdc80* mRNA levels are downregulated in white adipose tissue from *ob/ob*, KKAY and diet-induced obese mice (7), but unregulated in white adipose tissue from the mild late-onset obesity model bombesin receptor subtype-3-deficient mouse (6).

We also profiled intracellular CCDC80 protein in the human adipocyte SGBS cell line during the differentiation process. Irrespective of the SGBS cell differentiation stage, a wide range of CCDC80 molecular forms was observed (within 150 and 75 kDa), particularly prominent being a molecular form of about 150 kDa. A similar CCDC80 protein pattern has previously been reported in primary cultured human adipocytes and 293 cells ectopically expressing human CCDC80, i.e. a large number of molecular forms within 150 and 50 kDa (7). The molecular form of 150 kDa is believed to be due to N-linked glycosylation of the protein (9, 12), although the role that this posttranslational modification has on the functionality of CCDC80 protein is unknown. Therefore, consistent observations of abundant high molecular forms of the CCDC80 protein attributable to glycosylated forms have been obtained in cultured adipocytes, whereas we observed minor presence of these forms in adipose tissue depots. On the other hand, we assessed the highest total CCDC80 protein content in mature adipocytes compared to earlier differentiating stages, which was concordant with the highest levels of mRNA. Expression of the CCDC80 gene during the adipogenic process has been described at the mRNA level in the 3T3L1 adipocyte cell line, where levels in mature adipocytes are higher than (7) or similar to (10) those in confluent preadipocytes. During early stages of differentiation, a transient repression (7, 10) is shown in these cells, associated with the inhibitory effect of the added adipogenic factors

dexamethasone plus IBMX (10). Similarly, we observed a reduction in CCDC80 protein content during early differentiation of confluent SGBS preadipocytes, which could also be linked to the repressor action of the adipogenic factors dexamethasone, IBMX plus rosiglitazone.

The presence of the CCDC80 protein in the culture media of SGBS cells was detected using ELISA at all the differentiation stages, namely postconfluent preadipocytes, differentiating and mature adipocytes. A reduced accumulation was shown in the early stages of cell differentiation, in parallel with decreased intracellular protein levels. However, lower CCDC80 protein levels were released by mature adipocytes despite maximal intracellular accumulation. Previous studies have shown that CCDC80 is secreted by cultured human adipocytes (7), differentiated 3T3L1 adipocytes (10) and COS7 cells expressing mouse *Ccdc80* (12). Moreover, transfected *Ccdc80* is secreted from COS7 cells in the glycosylated and nonglycosylated forms (12).

Then, we analysed plasma CCDC80 protein levels in human subjects and its association with obesity and obesity-related diseases. We reasoned that since the expression of the CCDC80 gene is predominant in adipose tissue and CCDC80 protein was upregulated in visceral fat in obesity, obesity-linked processes could be associated with circulating CCDC80 protein. A previous study did not detect *Ccdc80* protein in mouse serum, thereby suggesting that the technique used was not sensitive enough for its detection or that this protein acts as a local factor in adipose tissue (11). Using ELISA, we detected plasma CCDC80 protein levels in a range of values from 0.24 to 9.1 ng/ml in the two cohorts combined comprising a wide BMI range (20 to 60 Kg/m²).

In the cohort with different degrees of obesity (lean to morbidly obese subjects), we observed no association between CCDC80 protein and BMI or age, but did find a negative correlation with acute insulin response to glucose (AIRg). Interestingly, lack of the *Ccdc80* gene in mice (11) fed a high-fat diet exacerbates glucose intolerance and impairs glucose-stimulated insulin secretion *in vivo*, which suggested that *Ccdc80* protein, either circulating or locally derived (*Ccdc80* expression is relatively low in the whole pancreas but insignificant in isolated islets), modulates insulin secretion.

Another finding in this cohort was that CCDC80 was positively associated with inflammatory markers, such as blood neutrophil count and circulating MCP-1 levels. Obesity is a low-grade inflammatory condition linked to some inflammatory mediators, such as neutrophil count (28) and the chemoattractive protein MCP-1 (29). In fact, circulating MCP-1 levels is one of the factors that links obesity with obesity-related metabolic complications such as atherosclerosis (30), insulin resistance (30-32) and hepatic steatosis (32). The fact that circulating CCDC80 was not linked to BMI but to inflammatory markers suggests that it reflects the inflammatory condition independently of obesity.

Data on the cohort of morbidly obese subjects yielded some more evidence of the link between circulating CCDC80 and inflammatory markers, and revealed an association with inflammatory and metabolic liver and vascular disease. We found that plasma CCDC80 protein levels were associated not only with the inflammatory marker C-reactive protein, but also with the degree of hepatic steatosis. Moreover, carotid intima-media thickness, as a marker of atherosclerosis, was also linked to circulating CCDC80 concentration. Again, there was a lack of association with BMI or age. In fact, fatty

liver disease and the risk of cardiovascular disease are known to be closely associated with circulating inflammatory markers. For instance, C-reactive protein has been associated with liver steatosis independently of visceral adiposity in some studies (33, 34), and it is known to be closely linked to carotid intima-media thickness (35). In addition, nonalcoholic steatohepatitis can predict a more atherogenic risk profile (34). Gene expression of the CCDC80 gene in human liver has been found insignificant (7, 10) and there are no data on the expression in atherogenic lesions. Thus, we could speculate that circulating CCDC80 protein may either have a role in these pathogenic processes or is a comorbid parameter associated with severe obesity. There is no evidence of the action of CCDC80 protein in liver; abrogation of *Ccdc80* in mouse has been shown to modulate some circadian clock genes in white adipose tissue, skeletal muscle and pancreas at the transcriptomic level, but effects on liver have not been examined (11).

In conclusion, we show upregulation of CCDC80 protein levels in visceral adipose tissue of obese patients compared to lean, suggesting that CCDC80 may be one of the components of the obesity altered secretome of this depot and may be linked to metabolic changes in other organs. In this regard, we report an association between plasma CCDC80 protein levels and impaired insulin secretion, but also with circulating inflammatory markers, in a cohort with a wide BMI range, independently of obesity. These data indicate that upregulation of the CCDC80 protein is linked to the obesity-associated inflammatory condition rather than to obesity itself and may modulate insulin secretion *in vivo*. In morbid obesity, plasma CCDC80 protein levels were associated with inflammation-associated chronic complications, such as fatty liver disease and

atherosclerosis, suggesting that CCDC80 may either be a pathogenic or comorbid factor for these diseases.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the following grants: SAF2012-37480 and SAF2012-36186 from the Spanish *Ministerio de Ciencia e Innovación* (MCI). FIS PI11/0085 and FIS PI11/00214 from the Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), and FLORINASH (VII FP). *CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas* (CB07/08/0012) and *CIBERobn Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición* (CB06/03/010). SF-V acknowledges support from the “Miguel Servet” tenure track program (CP10/00438) from FIS co-financed by the European Regional Development Fund (ERDF).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1. Analysis of CCDC80 protein content in SAT and VAT depots from lean and obese subjects. Western blot analyses were performed on tissue extracts (20 µg protein). Membranes were hybridised with antibodies against CCDC80 and FAA. A representative image is shown. Bands were quantified and the ratio of intensities between CCDC80 and control gene FAA was calculated. Data are expressed in arbitrary units and are the means ± SEM from 5 samples. The significance of differences is: #p < 0.05 between different depots in lean subjects; and *p < 0.05 between VAT depots in lean versus obese subjects.

FIGURE 2. CCDC80 gene expression and protein secretion in the human SGBS adipocyte cell line during differentiation. CCDC80 protein content was analysed by immunoblotting using GAPDH as a control protein in cell extracts from: (A) confluent preadipocytes (day 0), differentiating adipocytes (days 1 to 8) and mature adipocytes (day 14) and (B) confluent preadipocytes incubated without or with 25 nM dexamethasone (DXM) plus 0.5 mM IBMX and 2 μ M rosiglitazone (RSG) for 16 h. (A,B) A representative image is shown. Ratios of intensity of CCDC80 bands compared to intensity of GAPDH are expressed as a percentage of (untreated) confluent preadipocyte values and are the means \pm SEM from 2 experiments performed in triplicate. The significance of differences is versus (untreated) confluent preadipocytes * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$. (C) Relative CCDC80 mRNA levels to the reference 18S rRNA gene were measured in confluent preadipocytes, differentiating adipocytes (4 days post-differentiation) and mature adipocytes (14 days post-differentiation). Data are means \pm SEM of $2^{-\Delta C_p} \times 10^3$ from 2 experiments performed in triplicate. The significance of the differences with respect to preadipocytes is * $p < 0.05$. (D) CCDC80 protein content was analyzed by ELISA in 48 h-conditioned media from confluent preadipocytes induced to differentiate for 2, 6, 9 or 14 days. Data are expressed as a percentage of the values in cells 2 days-postdifferentiation (1.42 ± 0.07 ng/ml/ μ g protein) and are means \pm SEM from at least 2 experiments performed in triplicate. The significance of the difference with respect to cells 2 days-postdifferentiation is * $p < 0.05$.

FIGURE 3. Plasma CCDC80 protein levels in a cohort with different degrees of obesity in association with insulin secretion and inflammation parameters.

Bivariate correlation analysis showing association of CCDC80 levels with: (A) acute

insulin response to glucose (AIRg values, which were logarithmically transformed to normalise values), $r = -0.35$ and $p = 0.02$; (B) circulating IGF-1 levels, $r = -0.43$ and $p = 0.01$; (C) blood neutrophil count, $r = 0.26$ and $p = 0.07$; and (D) circulating MCP-1 levels, $r = 0.27$ and $p = 0.09$.

FIGURE 4. Plasma CCDC80 protein levels in a cohort of morbidly obese patient in association with liver steatosis and carotid atherosclerosis. (A) Boxplots showing CCDC80 levels (median value and 25th and 75th percentiles) according to degree of hepatic steatosis in consecutive morbidly obese patients without steatosis ($n = 11$) compared with slight ($n = 10$), moderate ($n = 5$) and severe steatosis ($n = 2$). (B) Bivariate correlation analysis between plasma CCDC80 protein levels and internal carotid intima-media thickness.

REFERENCES

1. Leal, V. e. O., and D. Mafra. 2013. Adipokines in obesity. *Clin Chim Acta* **419**: 87-94.
2. Gray, S. L., and A. J. Vidal-Puig. 2007. Adipose tissue expandability in the maintenance of metabolic homeostasis. *Nutr Rev* **65**: S7-12.
3. Rabe, K., M. Lehrke, K. G. Parhofer, and U. C. Broedl. 2008. Adipokines and insulin resistance. *Mol Med* **14**: 741-751.
4. Northcott, J. M., A. Yeganeh, C. G. Taylor, P. Zahradka, and J. T. Wigle. 2012. Adipokines and the cardiovascular system: mechanisms mediating health and disease. *Can J Physiol Pharmacol* **90**: 1029-1059.

5. Buechler, C., J. Wanninger, and M. Neumeier. 2011. Adiponectin, a key adipokine in obesity related liver diseases. *World J Gastroenterol* **17**: 2801-2811.
6. Aoki, K., Y. J. Sun, S. Aoki, K. Wada, and E. Wada. 2002. Cloning, expression, and mapping of a gene that is upregulated in adipose tissue of mice deficient in bombesin receptor subtype-3. *Biochem Biophys Res Commun* **290**: 1282-1288.
7. Okada, T., H. Nishizawa, A. Kurata, S. Tamba, M. Sonoda, A. Yasui, Y. Kuroda, T. Hibuse, N. Maeda, S. Kihara, T. Hadama, K. Tobita, S. Akamatsu, K. Maeda, I. Shimomura, and T. Funahashi. 2008. URB is abundantly expressed in adipose tissue and dysregulated in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* **367**: 370-376.
8. Marcantonio, D., L. E. Chalifour, M. A. Alaoui-Jamali, L. Alpert, and H. T. Huynh. 2001. Cloning and characterization of a novel gene that is regulated by estrogen and is associated with mammary gland carcinogenesis. *Endocrinology* **142**: 2409-2418.
9. Bommer, G. T., C. Jäger, E. M. Dürr, S. Baehts, S. T. Eichhorst, T. Brabletz, G. Hu, T. Fröhlich, G. Arnold, D. C. Kress, B. Göke, E. R. Fearon, and F. T. Kolligs. 2005. DRO1, a gene down-regulated by oncogenes, mediates growth inhibition in colon and pancreatic cancer cells. *J Biol Chem* **280**: 7962-7975.
10. Tremblay, F., T. Revett, C. Huard, Y. Zhang, J. F. Tobin, R. V. Martinez, and R. E. Gimeno. 2009. Bidirectional modulation of adipogenesis by the secreted protein Ccdc80/DRO1/URB. *J Biol Chem* **284**: 8136-8147.
11. Tremblay, F., C. Huard, J. Dow, T. Gareski, S. Will, A. M. Richard, J. Syed, S. Bailey, K. A. Brenneman, R. V. Martinez, M. Perreault, Q. Lin, and R. E. Gimeno. 2012. Loss of coiled-coil domain containing 80 negatively modulates glucose homeostasis in diet-induced obese mice. *Endocrinology* **153**: 4290-4303.

12. Liu, Y., M. Monticone, L. Tonachini, M. Mastrogiacomo, V. Marigo, R. Cancedda, and P. Castagnola. 2004. URB expression in human bone marrow stromal cells and during mouse development. *Biochem Biophys Res Commun* **322**: 497-507.
13. Manabe, R., K. Tsutsui, T. Yamada, M. Kimura, I. Nakano, C. Shimono, N. Sanzen, Y. Furutani, T. Fukuda, Y. Oguri, K. Shimamoto, D. Kiyozumi, Y. Sato, Y. Sado, H. Senoo, S. Yamashina, S. Fukuda, J. Kawai, N. Sugiura, K. Kimata, Y. Hayashizaki, and K. Sekiguchi. 2008. Transcriptome-based systematic identification of extracellular matrix proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 12849-12854.
14. Organization, W. H. 2000. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation Geneva. WHO Tech Rep Ser 894. *In*. 1st ed. Geneva: World Health Organization, editor.
15. Moreno-Navarrete, J., R. Martínez-Barricarte, V. Catalán, M. Sabater, J. Gómez-Ambrosi, F. Ortega, W. Ricart, M. Blüher, G. Frühbeck, S. Rodríguez de Cordoba, and J. Fernández-Real. 2010. Complement factor H is expressed in adipose tissue in association with insulin resistance. *Diabetes* **59**: 200-209.
16. Bergman, R., R. Prager, A. Volund, and J. Olefsky. 1987. Equivalence of the insulin sensitivity index in man derived by the minimal model method and the euglycemic glucose clamp. *J Clin Invest* **79**: 790-800.
17. Moreno-Navarrete, J. M., P. Petrov, M. Serrano, F. Ortega, E. García-Ruiz, P. Oliver, J. Ribot, W. Ricart, A. Palou, M. L. Bonet, and J. M. Fernández-Real. 2013. Decreased RB1 mRNA, protein, and activity reflect obesity-induced altered adipogenic capacity in human adipose tissue. *Diabetes* **62**: 1923-1931.
18. Serrano, M., J. M. Moreno-Navarrete, J. Puig, M. Moreno, E. Guerra, F. Ortega, G. Xifra, W. Ricart, and J. M. Fernández-Real. 2013. Serum lipopolysaccharide-binding protein as a marker of atherosclerosis. *Atherosclerosis* **230**: 223-227.

19. Kleiner, D. E., E. M. Brunt, M. Van Natta, C. Behling, M. J. Contos, O. W. Cummings, L. D. Ferrell, Y. C. Liu, M. S. Torbenson, A. Unalp-Arida, M. Yeh, A. J. McCullough, A. J. Sanyal, and N. S. C. R. Network. 2005. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **41**: 1313-1321.
20. Wabitsch, M., R. Brenner, I. Melzner, M. Braun, P. Möller, E. Heinze, K. Debatin, and H. Hauner. 2001. Characterization of a human preadipocyte cell strain with high capacity for adipose differentiation. *Int J Obes Relat Metab Disord* **25**: 8-15.
21. Osorio-Conles, O., M. Guitart, M. R. Chacón, E. Maymo-Masip, J. M. Moreno-Navarrete, M. Montori-Grau, S. Näf, J. M. Fernandez-Real, J. Vendrell, and A. M. Gómez-Foix. 2011. Plasma PTX3 protein levels inversely correlate with insulin secretion and obesity, whereas visceral adipose tissue PTX3 gene expression is increased in obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **301**: E1254-1261.
22. Pérez-Pérez, R., J. A. López, E. García-Santos, E. Camafeita, M. Gómez-Serrano, F. J. Ortega-Delgado, W. Ricart, J. M. Fernández-Real, and B. Peral. 2012. Uncovering suitable reference proteins for expression studies in human adipose tissue with relevance to obesity. *PLoS One* **7**: e30326.
23. Nam, S. Y., E. J. Lee, K. R. Kim, B. S. Cha, Y. D. Song, S. K. Lim, H. C. Lee, and K. B. Huh. 1997. Effect of obesity on total and free insulin-like growth factor (IGF)-1, and their relationship to IGF-binding protein (BP)-1, IGFBP-2, IGFBP-3, insulin, and growth hormone. *Int J Obes Relat Metab Disord* **21**: 355-359.
24. Frystyk, J., C. Skjaerbaek, E. Vestbo, S. Fisker, and H. Orskov. 1999. Circulating levels of free insulin-like growth factors in obese subjects: the impact of type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* **15**: 314-322.

25. Ibrahim, M. M. 2010. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes Rev* **11**: 11-18.
26. Insenser, M., R. Montes-Nieto, N. Vilarrasa, A. Lecube, R. Simó, J. Vendrell, and H. F. Escobar-Morreale. 2012. A nontargeted proteomic approach to the study of visceral and subcutaneous adipose tissue in human obesity. *Mol Cell Endocrinol* **363**: 10-19.
27. Catalán, V., J. Gómez-Ambrosi, A. Rodríguez, and G. Frühbeck. 2012. Role of extracellular matrix remodelling in adipose tissue pathophysiology: relevance in the development of obesity. *Histol Histopathol* **27**: 1515-1528.
28. Mócsai, A. 2013. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J Exp Med* **210**: 1283-1299.
29. Panee, J. 2012. Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) in obesity and diabetes. *Cytokine* **60**: 1-12.
30. Kim, C. S., H. S. Park, T. Kawada, J. H. Kim, D. Lim, N. E. Hubbard, B. S. Kwon, K. L. Erickson, and R. Yu. 2006. Circulating levels of MCP-1 and IL-8 are elevated in human obese subjects and associated with obesity-related parameters. *Int J Obes (Lond)* **30**: 1347-1355.
31. Kamei, N., K. Tobe, R. Suzuki, M. Ohsugi, T. Watanabe, N. Kubota, N. Ohtsuka-Kowatari, K. Kumagai, K. Sakamoto, M. Kobayashi, T. Yamauchi, K. Ueki, Y. Oishi, S. Nishimura, I. Manabe, H. Hashimoto, Y. Ohnishi, H. Ogata, K. Tokuyama, M. Tsunoda, T. Ide, K. Murakami, R. Nagai, and T. Kadowaki. 2006. Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *J Biol Chem* **281**: 26602-26614.
32. Kanda, H., S. Tateya, Y. Tamori, K. Kotani, K. Hiasa, R. Kitazawa, S. Kitazawa, H. Miyachi, S. Maeda, K. Egashira, and M. Kasuga. 2006. MCP-1

contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest* **116**: 1494-1505.

33. Li, Y., L. Liu, B. Wang, J. Wang, and D. Chen. 2014. Simple steatosis is a more relevant source of serum inflammatory markers than omental adipose tissue. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* **38**: 46-54.

34. Targher, G., L. Bertolini, S. Rodella, G. Lippi, M. Franchini, G. Zoppini, M. Muggeo, and C. P. Day. 2008. NASH predicts plasma inflammatory biomarkers independently of visceral fat in men. *Obesity (Silver Spring)* **16**: 1394-1399.

35. Corrado, E., M. Rizzo, G. Coppola, K. Fattouch, G. Novo, I. Marturana, F. Ferrara, and S. Novo. 2010. An update on the role of markers of inflammation in atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* **17**: 1-11.

Figure 1

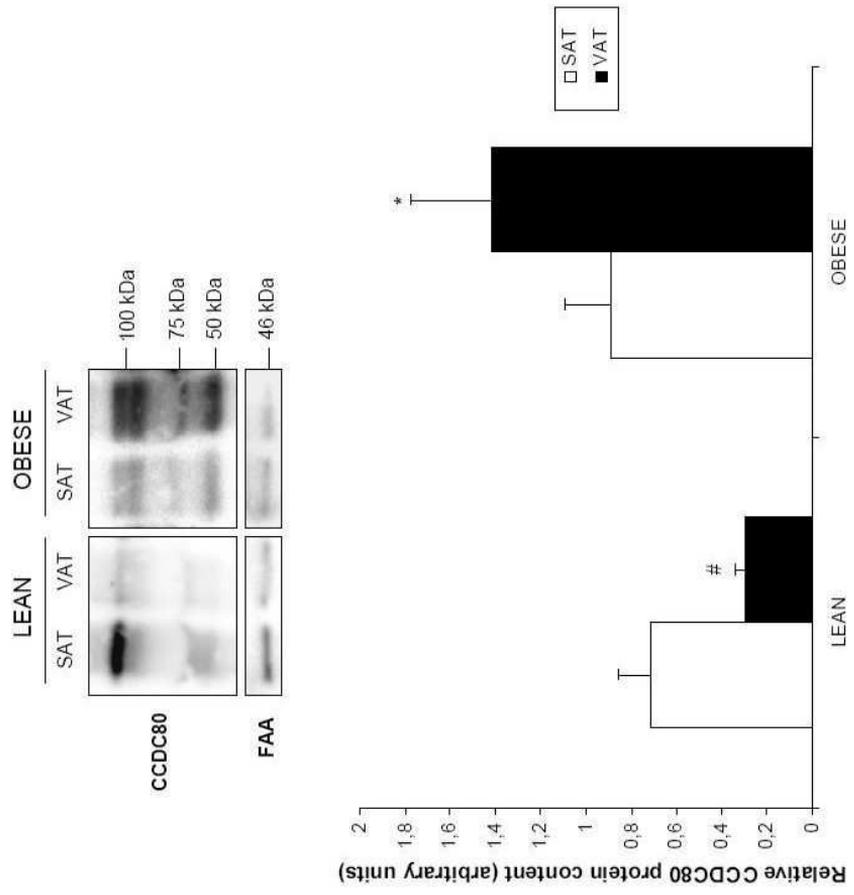


Figure 2

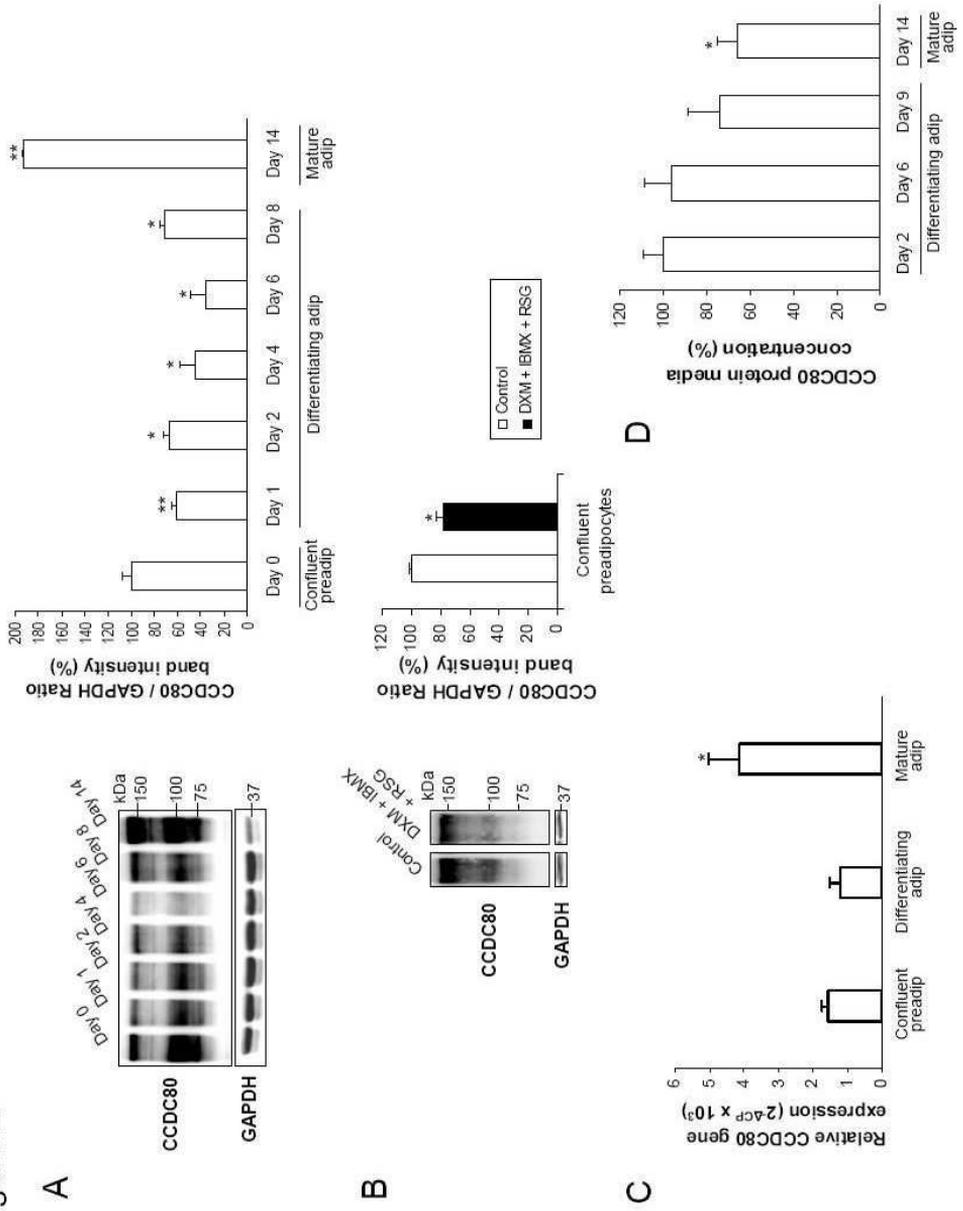


Figure 3

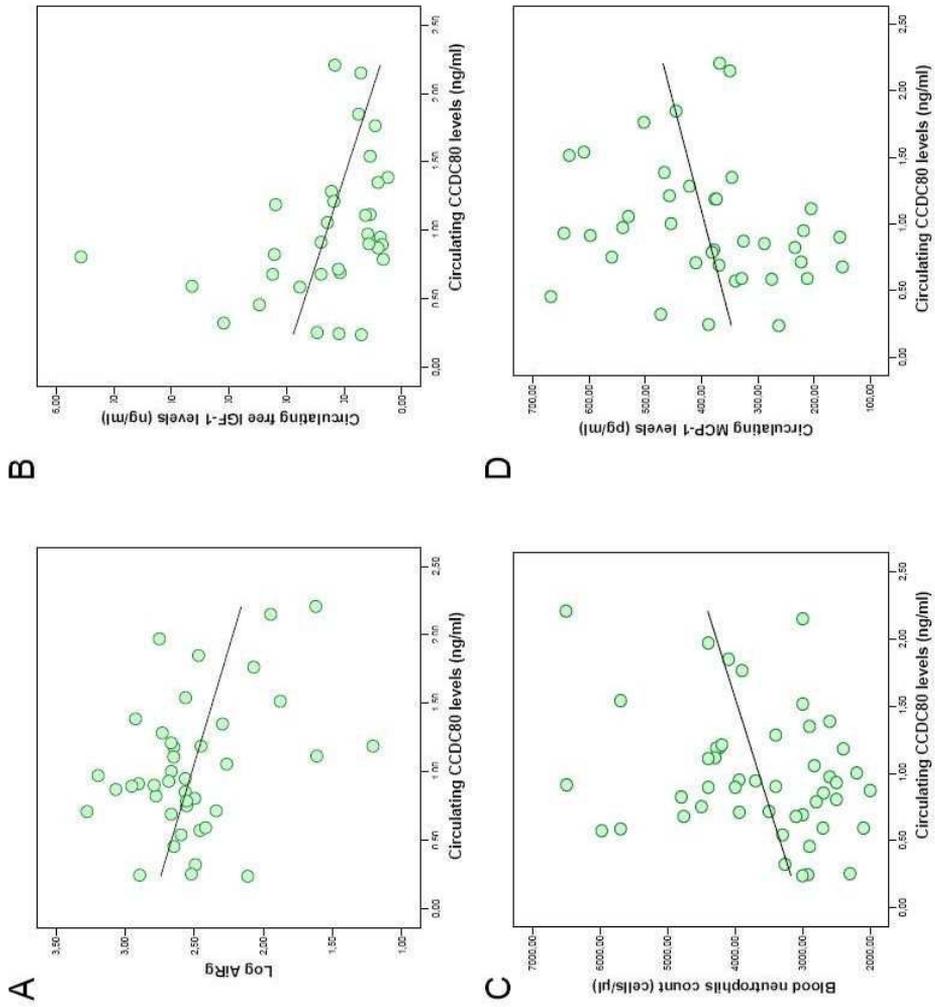
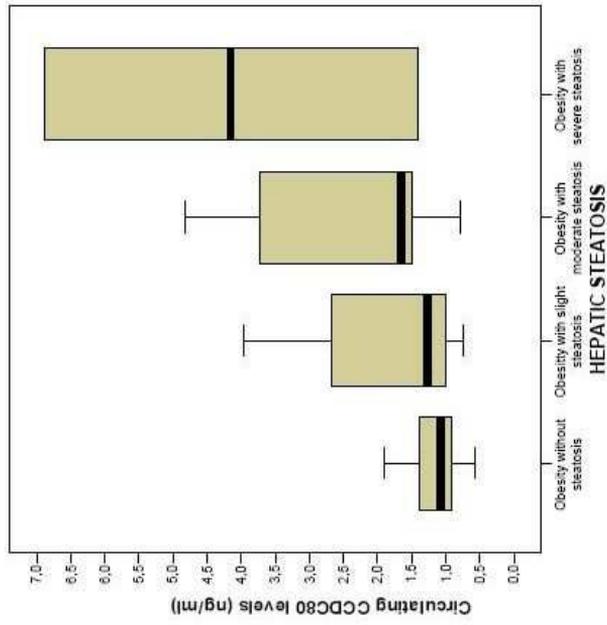
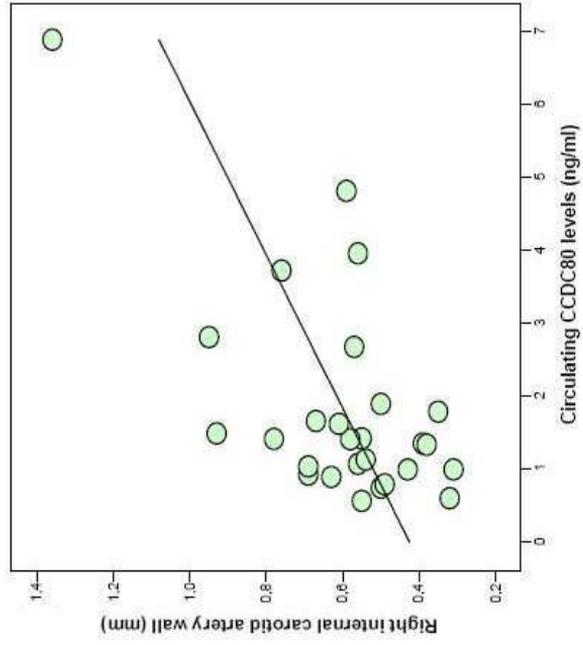


Figure 4

A



B



PUBLICACIÓN 3

Fatty Acid Transport Protein 1 (FATP1) Localizes in Mitochondria in Mouse Skeletal Muscle and Regulates Lipid and Ketone Body Disposal

Guitart M, Osorio-Conles O, Pentinat T, Cebrià J, García-Villoria J, Sala D, Sebastián D, Zorzano A, Ribes A, Jiménez-Charón JC, García-Martínez C, Gómez-Foix AM. PLoS One. 2014 May 23;9(5):e98109. doi: 10.1371/journal.pone.0098109. eCollection 2014.

RESUMEN

La proteína transportadora de ácidos grasos FATP1 se localiza en la mitocondria en células de músculo esquelético de ratón y regula la disponibilidad de lípidos y cuerpos cetónicos

FATP1 es considerado un mediador en la captación de FAs por parte del músculo esquelético, pese a que su localización subcelular y su papel en el control metabólico no han sido totalmente descritos. En este trabajo examinamos la localización de FATP1 y los efectos metabólicos de su sobreexpresión en músculo esquelético de ratón. La proteína FATP1 se detectó en las fracciones de membrana mitocondrial y plasmática, obtenidas mediante centrifugación diferencial, de músculo gastrocnemius de ratón. FATP1 se encontró en alta cantidad en mitocondrias purificadas, en la membrana externa y en la porción soluble intermembrana, pero no en las subfracciones enriquecidas en membrana interna y matriz mitocondrial. Mediante microscopía electrónica *immunogold* se localizó FATP1-GFP en la mitocondria de miotubos C2C12 transfectados. FATP1 se sobreexpresó en el músculo gastrocnemius de ratón mediante adenovirus transducidos en las extremidades inferiores de ratones recién nacidos, alimentados tras el destete con una dieta normal o HFD. En comparación con la expresión de GFP, FATP1 no alteró el peso corporal, los niveles séricos de glucosa posprandial, de insulina o triglicéridos ni la tolerancia sistémica a la glucosa, en ninguna de las dietas. Sin embargo, los niveles de FAs fueron menores y los de β -hidroxibutirato mayores en los ratones FATP1 que en los GFP, independientemente de la dieta. Además, el contenido intramuscular en triglicéridos fue menor en los ratones FATP1 respecto a los GFP sin tener en cuenta la dieta, mientras que el contenido en β -hidroxibutirato no cambió en los alimentados con dieta grasa. La sobreexpresión de FATP1 mediante electroporación aumentó la oxidación de palmitato a CO_2 , pero no de metabolitos solubles en ácido, mientras que la producción de CQA a partir de β -hidroxibutirato fue inhibida y la de glucosa no varió en las tiras de gastrocnemius aisladas. En resumen, FATP1 se localizó en la mitocondria, en las fracciones de membrana externa e intermembrana, de músculo esquelético de ratón, lo que podría ser

crucial para sus efectos metabólicos. La sobreexpresión de FATP1 incrementó la disponibilidad tanto de FAs sistémicos como triglicéridos intramusculares. De forma consistente, no contribuyó a la desregulación metabólica inducida por la dieta grasa. Sin embargo, FATP1 produjo una hipercetonemia, probablemente secundaria al ahorro en la oxidación de cuerpos cetónicos resultante del incremento de la oxidación de los FAs.

Tipo de artículo: *Research article*

Factor de impacto (según ResearchGate®, 2014) 3.53

Participación del autor:

Extracción de muestras de tejidos y centrifugación diferencial subcelular.

Extracción de RNA y determinación de los niveles de expresión génica mediante RT-PCR.

Extracción de proteína y cuantificación mediante *immunoblotting*.

Preparación de tiras aisladas de gastrocnemius para su incubación con palmitato, cuerpos cetónicos y glucosa marcados radioactivamente.

Participación en la redacción de Resultados del artículo.

Fatty Acid Transport Protein 1 (FATP1) Localizes in Mitochondria in Mouse Skeletal Muscle and Regulates Lipid and Ketone Body Disposal

Maria Guitart^{1*}, Óscar Osorio-Conles^{1,6}, Thais Pentinat², Judith Cebrià², Judit García-Villoria^{3,4}, David Sala^{1,5,6}, David Sebastián^{1,5,6}, Antonio Zorzano^{1,5,6}, Antonia Ribes^{3,4}, Josep C. Jiménez-Chillarón², Celia García-Martínez⁷, Anna M. Gómez-Foix^{1,6}

1 Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona (UB), Institut de Biomedicina de la UB, Barcelona, Spain, **2** Hospital Sant Joan de Déu, Endocrinology, Esplugues, Barcelona, Spain, **3** Sección de Errores Congénitos del Metabolismo (IBC), Servicio de Bioquímica y Genética Molecular, Hospital Clínico, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Barcelona, Spain, **4** CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Spain, **5** Institute for Research in Biomedicine, Barcelona, Spain, **6** CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Instituto de Salud Carlos III, Spain, **7** Departament de Patologia i Terapèutica Experimental, UB, Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

Abstract

FATP1 mediates skeletal muscle cell fatty acid import, yet its intracellular localization and metabolic control role are not completely defined. Here, we examine FATP1 localization and metabolic effects of its overexpression in mouse skeletal muscle. The FATP1 protein was detected in mitochondrial and plasma membrane fractions, obtained by differential centrifugation, of mouse gastrocnemius muscle. FATP1 was most abundant in purified mitochondria, and in the outer membrane and soluble intermembrane, but not in the inner membrane plus matrix, enriched subfractions of purified mitochondria. Immunogold electron microscopy localized FATP1-GFP in mitochondria of transfected C2C12 myotubes. FATP1 was overexpressed in gastrocnemius mouse muscle, by adenovirus-mediated delivery of the gene into hindlimb muscles of newborn mice, fed after weaning a chow or high-fat diet. Compared to GFP delivery, FATP1 did not alter body weight, serum fed glucose, insulin and triglyceride levels, and whole-body glucose tolerance, in either diet. However, fatty acid levels were lower and β -hydroxybutyrate levels were higher in FATP1- than GFP-mice, irrespective of diet. Moreover, intramuscular triglyceride content was lower in FATP1- versus GFP-mice regardless of diet, and β -hydroxybutyrate content was unchanged in high-fat-fed mice. Electroporation-mediated FATP1 overexpression enhanced palmitate oxidation to CO₂, but not to acid-soluble intermediate metabolites, while CO₂ production from β -hydroxybutyrate was inhibited and that from glucose unchanged, in isolated mouse gastrocnemius strips. In summary, FATP1 was localized in mitochondria, in the outer membrane and intermembrane parts, of mouse skeletal muscle, what may be crucial for its metabolic effects. Overexpressed FATP1 enhanced disposal of both systemic fatty acids and intramuscular triglycerides. Consistently, it did not contribute to the high-fat diet-induced metabolic dysregulation. However, FATP1 lead to hyperketonemia, likely secondary to the sparing of ketone body oxidation by the enhanced oxidation of fatty acids.

Citation: Guitart M, Osorio-Conles Ó, Pentinat T, Cebrià J, García-Villoria J, et al. (2014) Fatty Acid Transport Protein 1 (FATP1) Localizes in Mitochondria in Mouse Skeletal Muscle and Regulates Lipid and Ketone Body Disposal. PLoS ONE 9(5): e98109. doi:10.1371/journal.pone.0098109

Editor: Cedric Moro, INSERM/UMR 1048, France

Received: October 29, 2013; **Accepted:** April 29, 2014; **Published:** May 23, 2014

Copyright: © 2014 Guitart et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported by the following grants: SAF2009-07559 and SAF2012-37480 from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (MCI); and PI 08/0733, PI08/1195, CIBERDEM de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CB07/08/0012). 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.

* E-mail: maguita022002@yahoo.es

Introduction

The cellular uptake of long-chain fatty acids is known to be largely protein mediated and several protein families have been involved in this process. One of these families is the fatty acid transport protein (FATP), currently with six members identified in mammalian genomes (FATP1–6) [1,2]. One of these family members is the FATP1 gene, which is expressed at high levels in skeletal muscle (skm), heart and adipose tissue, and at low levels in brain, kidney, lung and liver in mice [3].

FATP1 is an integral membrane protein with one transmembrane domain in the amino terminus region of the protein [4] and displays intrinsic acyl-CoA synthetase activity, which is nevertheless lower relative to other fatty acid CoA ligases, such as FATP4

and acyl-CoA synthetase long-chain family member 1 (ACSL1) [5]. FATP1 has been localized in the plasma membrane of differentiated 3T3-L1 adipocytes [3,6,7], or insulin-stimulated 3T3-L1 adipocytes [6,7], and 293 cells [8]; however, FATP1 has consistently been found in intracellular compartments of adipocytes and muscle cells in culture. In 3T3-L1 adipocytes, it was found in a perinuclear compartment overlapping with a Golgi marker in non-stimulated cells [7], and in mitochondria [9]; in another study, FATP1 was localized in the endoplasmic reticulum but not in mitochondria [10]. In cultured human myotubes, we showed that FATP1 is not present in the plasma membrane, but intracellularly, in a reticular and perinuclear pattern, partially overlapping with a Golgi marker [11]. Furthermore, we localized

FATP1 in the mitochondria-enriched fractions of cultured human and C2C12 muscle cells [12]; and co-localized a tagged FATP1-GFP fusion protein with mitochondrial markers in both C2C12 [12] and L6E9 [13] muscle cells. Sarcolemmal staining and pronounced intracellular FATP1 localization in an undefined vesicle population has been observed in isolated mouse soleus muscle [14], as well as the presence of FATP1 in the t-tubule and sarcolemma fractions of lower hindlimb rat muscles [15]. However, no evidence was obtained for the localization of transfected FATP1 on mitochondrial membranes in mature rat skm [16].

FATP1 is able to enhance fatty acid uptake in cultured skm cells [11] and in rodent muscle tissue [16]. However, on the basis of its subcellular localization, it is argued whether FATP1-mediated cell fatty acid import is due to transbilayer movement of fatty acids in the plasma membrane or to a driving force associated with its intrinsic acyl-CoA synthetase, which might trap the entering fatty acids as acyl-CoAs [10,17] and direct its metabolism. In fact, our studies in cultured skm cells showed that FATP1 targets fatty acids towards triacylglycerol synthesis [11,13], whereas fatty acid oxidation is either moderately stimulated [13] or slightly reduced [11]. In contrast, a previous study [16] addressing the role of FATP1 in rodent muscle metabolic control, by means of its overexpression, showed different fatty acid targeting, i.e. electrotransfection of FATP1 into skm of rats increases fatty acid oxidation but not triacylglycerol synthesis in isolated muscle preparations; while muscle-specific overexpression of FATP1 in transgenic mice elevates the rate of *in vivo* fatty acid uptake in skm of mice on a chow diet, but not of high-fat diet-induced intramuscular triglyceride accumulation. It was concluded that FATP1 does not promote mouse intramuscular triglyceride accumulation and whole body insulin resistance [16]. In addition to fatty acid metabolism, FATP1 is also able to enhance glucose metabolism in cultured skm cells, in which it exerts a powerful stimulation of glucose oxidation and activates the pyruvate dehydrogenase (PDH) complex [12].

Genetic ablation of FATP1 in mice does not change basal fatty acid uptake, but reduces its stimulation by insulin, in isolated muscle strips and delays the insulin-induced clearance of serum fatty acids [14]. Moreover, abrogation of FATP1 gene protects mice from the fat-induced accumulation of fatty acyl-CoA and fat-induced insulin resistance in skm [18]. In fact, FATP1 gene knockout in mice protects against high-fat diet-induced reduction of insulin-stimulated whole-body glucose turnover [18]; and impairment of insulin tolerance and signs of metabolic syndrome [14]. In this regard, FATP1 inhibition is a therapeutic target for insulin resistance [19].

The aim of this work was to gain new insight into the subcellular localization and role of FATP1 in metabolic control in skm tissue. Thus, we examined the possible mitochondrial localization of FATP1 in rodent skm and conducted new investigations on the localization of FATP1 in the mitochondria of C2C12 muscle cells. Moreover, we overexpressed FATP1 in gastrocnemius mouse muscle, by means of adenovirus or electroporation, to test its effects on skm lipid metabolism and the expression of key control genes in ketone body metabolism and glucose versus fatty acid disposal, on a normal chow diet and following fat-induced metabolic dysregulation.

Materials and Methods

Ethics Statement

The animal protocols were approved by the Universitat de Barcelona Animal Care and Use Committee (Permit number:

DMAH-5444). Animal sacrifice was performed under CO₂ anesthesia.

Gene transfer methods, cell culture and animals

Plasmids pGFP (pEGFP-N1) and p-FATP1-GFP [11] were used. The C2C12 cell line was grown in DMEM medium with 10% FBS and was induced to differentiate in DMEM with 10% horse serum for 4 days. The C2C12 cell line [20] was transfected with plasmids pGFP and/or p-FATP1-GFP by means of GeneJuice (Merck Millipore, Darmstadt, Germany).

Recombinant adenoviruses expressing the cDNA of mouse FATP1 (Ad-FATP1) or GFP (Ad-GFP) have been described previously [11]. For delivery to mice, adenoviruses produced in 293 cells were purified using the ViraBind purification kit (Cell Biolabs, San Diego, USA) and purified virus preparations were desalted using Microspin G-25 columns. Two separate batches of littermates, 11 males and 30 females, were used. Newborn (5 days old) C57BL6 male and female mice were injected in the gastrocnemius muscle in both legs with approximately 2×10^8 plaque forming units (pfu) (injected volume was less than 10 μ l) of Ad-GFP (5 males and 14 females) or Ad-FATP1 (6 males and 16 females), as described in [21]. Mice were weaned at 21 days. Thereafter, mice were randomly allocated to two dietary treatments: a standard laboratory chow diet (2014 Tekland Global, Harlan Iberica, Barcelona, Spain) (11 males and 10 females) or a high-fat diet (DIO rodent purified diet with 45% energy from fat, TestDiet, Richmond, USA) (20 females); and water *ad libitum*. When stated, animals were fasted by 15 h deprivation of food. Animals were sacrificed at 15- to 16-weeks of age in the fed state. Blood was collected and serum was stored at -20°C . Tissues were excised and immediately frozen in liquid N₂ and stored at -80°C . When stated tissue samples were powder in a mortar under liquid N₂ and thereafter homogenized.

Plasmids pGFP (pACCMV-GFP) or p-FATP1 (pACCMV-FATP1) [11] were used for electrotransfer studies. Plasmids were purified and resuspended in Endofree water (Qiagen, Crawley, UK) and dissolved in 0.9% NaCl. Three month-old mice (C57BL6/J) were anesthetized with ketamine/xylazine and 1 h before electrotransfer muscles were pretreated with hyaluronidase (10 U/muscle). Afterwards, 60 μ g of pGFP or pFATP1 were injected into the gastrocnemius muscle of both hindlimbs of 3 mice. Ten pulses of 20 ms each were applied to each hindlimb at 175 V/cm and 1 Hz using an electroporator (ECM 830; BTX, Holliston, USA). Mice were provided with standard laboratory chow diet. Animals were killed 10 days after the electrotransfer and gastrocnemius muscles were excised and immediately submerged in DMEM without glucose plus 0.1 mM free fatty acid BSA and 15 mM Hepes. Gastrocnemius strips were obtained by dissection with the aid of scissors and forceps with a modification of the protocol in [22]. Fat and connective tissue were removed under the scope. Strips of 20 to 25 mg wet weight were prepared (about 10 to 12 strips per muscle) and were then randomly mixed to account for regional differences in fiber type distribution [23]. Two strips were immediately frozen to determine FATP1 protein content and the rest of the strips were incubated for metabolic assays.

RNA extraction, reverse transcription and real-time PCR

Total RNA was extracted from tissue samples using the RNeasy minikit (Qiagen, Valencia, CA, USA) and homogenized using a Polytron (Kynematica Polytron, Westbury, USA). Total RNA (0.5 μ g) was retro-transcribed (RT) using TaqMan reverse transcription reagents from Applied Biosystems (Branchburg, USA) plus random hexamers. Real-time PCR was performed

using the ROCHE sequence detection system with the TaqMan universal PCR master mix and probes (Applied Biosystems) for the mouse *Slc27a1/FATP1*, *Oxct1* and *Pdk4* genes, using *Rn18s* as the endogenous control to normalize the crossing point (CP). For the *Hmgcs2* gene real-time PCR was performed using the ABI PRISM 7500 sequence detection system (Applied Biosystems) with the GoTaq qPCR master mix (Promega) and SyberGreen labelling and using the *Actb* gene as the endogenous control to normalize the threshold cycle (CT).

Preparation of muscle extracts, isolation of pure mitochondria by Percoll gradient and submitochondrial fractionation

To prepare extracts from skm tissue, 25 mg of frozen gastrocnemius muscle was crushed into small pieces and homogenized in 0.5 ml of buffer (0.25 M sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM HEPES (pH 7.4), 0.5 mM PMSF and 1 U/ml aprotinin) using a glass homogenizer (20 to 25 strokes). Extracts were homogenized with the aid of a 22 G syringe. An aliquot of extracts was centrifuged at 500 *g* for 5 min at 4°C and supernatants kept for further analysis (total extracts). When stated, the homogenate was centrifuged at 1500 *g* for 10 min at 4°C to obtain a pellet, highly enriched in large mitochondria that also contained nuclei [24], which was re-suspended in 60 μ l of homogenization buffer. The supernatant was further centrifuged at 10000 *g* for 10 min at 4°C, to obtain another pellet enriched in mitochondria and other organelles; the supernatant was kept and the pellet was re-suspended in 60 μ l of homogenization buffer.

Isolation of pure mitochondria from four gastrocnemius from two mice was performed as described in Wiczkowski et al. [25] with some modifications. Muscles were washed in ice-cold IB-1 buffer (225 mM mannitol, 75 mM sucrose, 0.5% BSA, 0.5 mM EGTA and 30 mM Tris-HCl (pH 7.4)), cut into small pieces using scissors and homogenized using first a polytron and then a glass homogenizer in a ratio of 4 ml IB-1 buffer per gram of muscle. The homogenate was centrifuged at 740 *g* for 5 min at 4°C and the supernatant was centrifuged again in the same conditions. The resulting supernatant was then centrifuged at 9000 *g* for 10 min at 4°C. The obtained mitochondria enriched pellet was resuspended in 2 ml of ice-cold IB-2 buffer (225 mM mannitol, 75 mM sucrose, 0.5% BSA and 30 mM Tris-HCl (pH 7.4)) and the supernatant was kept. An aliquot of this supernatant was ultracentrifuged at 100000 *g* for 60 min at 4°C. The resulting pellet designated "membrane fraction" (containing plasma membrane, lysosomes, microsomal fraction and large polyribosomes) was resuspended in 20 μ l of buffer (0.25 M sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM HEPES (pH 7.4), 0.5 mM PMSF and 1 U/ml aprotinin). The resuspended mitochondria enriched pellet was centrifuged at 10000 *g* for 10 min at 4°C, the obtained pellet was resuspended in 2 ml of ice-cold IB-3 buffer (225 mM mannitol, 75 mM sucrose and 30 mM Tris-HCl (pH 7.4)) and centrifuged at 10000 *g* for 10 min at 4°C. The final crude mitochondrial pellet was resuspended in 2 ml of MRB buffer (250 mM mannitol, 5 mM HEPES (pH 7.4) and 0.5 mM EGTA) and was then layered on top of Percoll medium (8 ml Percoll medium, 2 ml of crude mitochondria and 3.5 ml of MRB buffer) and centrifuged at 95000 *g* for 30 min at 4°C. After centrifugation, purified mitochondria appeared as a brownish band at the bottom of the tube. Pure mitochondria was collected by using a Pasteur pipette, diluted 10 times in MRB buffer and centrifuged at 6300 *g* for 10 min at 4°C. Mitochondrial pellet was resuspended in 2 ml of MRB buffer and centrifuged again at 6300 *g* for 10 min at 4°C. The pellet, containing purified mitochondria, was resuspended in 200 μ l of MRB buffer and stored at -20°C.

Part of the purified mitochondria obtained as indicated above were used to separate three fractions: inner membrane plus matrix, outer membrane and a soluble fraction (containing proteins localized between the membranes plus some solubilized outer membrane), as described in [26,27] with some modifications. One hundred μ g of purified mitochondria were treated with digitonin (2% solution in 250 mM sucrose) at a ratio of 1.2 mg of digitonin per 10 mg of mitochondrial protein. The resulting suspension was gently stirred for 15 min and then diluted with 3 volumes of a mannitol solution (210 mM mannitol plus 70 mM sucrose and 0.1 mM EDTA). The diluted suspension was centrifuged at 12000 *g* for 12 min at 4°C. The supernatant was carefully drawn off, and the pellet was gently resuspended in the same volume of the mannitol solution. This suspension was centrifuged again at the same speed for 12 min. The pellet from the second centrifugation was designated as the "inner membrane plus matrix fraction." The supernatants from the first and second centrifugation were pooled and further centrifuged at 105000 *g* for 90 min at 4°C. The pellet from this centrifugation was designated as the "outer membrane fraction," and the supernatant solution as the "soluble fraction."

Western blotting

Protein was resolved in 10% SDS-PAGE and immunoblotting was performed with antibodies against FATP1, SCOT/OXCT1, HMGCS2 and oxidoreductase-protein disulfide isomerase (PDI) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA); porin/voltage dependent anion channel (VDAC) and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (Cell Signalling Technology, Beverly, USA); α -actinin (Chemicon International, Temecula, USA), α -tubulin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), glucose transporter GLUT1 (Abcam, Cambridge, UK) and oxphos complex IV subunit I (mitochondrially encoded cytochrome c oxidase I (MTCO1)) (Life Technologies, Carlsbad, USA); and phosphorylation sites 1 and 2 of pyruvate dehydrogenase-E1 α (kindly provided by Dr. H. Pilegaard [28]). Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies were used and membranes were developed with ECL-Plus (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Protein bands were revealed and quantified using a LAS-3000 luminescent image analyzer (FujiFilm, Tokyo, Japan).

Transmission electron microscopy

Cultured cells were chemically fixed at 4°C with a mixture of 2% paraformaldehyde and 0.1% glutaraldehyde in phosphate buffer (PB) (pH 7.2). After washing with PB containing 50 mM glycine, cells were embedded in 12% gelatin and infused in 2.3 M sucrose. Mounted gelatine blocks were frozen in liquid nitrogen. Sections were prepared using an ultracyromicrotome (Leica EM Ultracut UC6/FC6, Vienna, Austria). Ultrathin cryosections were collected with 2% methylcellulose in 2.3 M sucrose. Cryosections were successively incubated at 37°C on drops of 2% gelatin in PBS for 20 min, 50 mM glycine in PBS for 15 min, 10% FBS in PBS for 10 min, and 5% FBS in PBS for 5 min. Then, they were incubated with anti-GFP antibody (Life Technologies) in 5% FBS in PBS for 30 min. After three washes with drops of PBS for 10 min, sections were incubated for 20 min using protein A coupled to 10 nm diameter colloidal gold particles (Cell Microscopy Center, Department of Cell Biology, University Medical Center Utrecht, The Netherlands), using a 1:60 dilution in 5% FBS/PBS. This was followed by three washes with drops of PBS for 10 min, and two washes with distilled water. As a control for non-specific binding of the colloidal gold-conjugated protein A, the primary polyclonal antibody was omitted. Observations were

made in a Jeol J1010 Electron Microscope (Jeol, Tokyo, Japan) with a SIS Megaview III CCD camera.

Metabolite and hormone assays

Insulin was measured in serum using mouse insulin ELISA (Merck Millipore). Serum triglycerides were measured using a colorimetric method (Biosystems, Barcelona, Spain). β -Hydroxybutyrate determination was performed in serum using the Cayman β -Hydroxybutyrate Assay kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, USA). Serum free fatty acids were measured using a Quantification Kit (BioVision, Mountain View, USA). Blood glucose was determined using a Glucometer Elite (Menarini, Barcelona, Spain).

For triglyceride assays in tissue samples, 15 mg of frozen powdered tissue were homogenized in a buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.9), 100 mM KCl, 20 mM KF, 0.5 mM EDTA and 0.05% lubrol. The resulting extracts were sonicated (three times for 10 s at 15 s intervals), centrifuged at 11000 g for 15 min at 4°C, and the supernatants were used for the determinations. Triglycerides were measured using a colorimetric method (Biosystems). The protein content of individual samples was determined using the Pierce BCA protein assay kit (Thermo Scientific, Rockford, USA).

For β -hydroxybutyrate tissue determination, 30 mg of frozen powdered tissue were homogenized in 600 μ l of distilled water using a Polytron, centrifuged at 800 g for 10 min and the supernatants collected. Organic acids from 500 μ l of supernatants were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry as TMS-derivates, as previously described [29], but using 7 μ l of 5 mM undecanodioic acid as the internal standard and SIM mode monitoring ions 191 and 345 for the detection of β -hydroxybutyric and undecanodioic acids respectively.

Glucose and insulin tolerance test

The glucose tolerance test was performed on 14-week-old conscious mice after an overnight fast. On the following day the mice were injected intraperitoneally with a glucose bolus of 2 g/kg body weight in a volume of no more than 200 μ l. Glucose was monitored before and 15, 30, 60 and 120 min after glucose administration. The area under the curve of glucose concentration was calculated using the trapezoidal rule. Animals were fed after the test. The insulin tolerance test was performed on 15-week-old conscious mice after 4 h fasting. The animals were provided with water *ad libitum*. An insulin bolus (1 unit/Kg of body weight) was administered by intraperitoneal injection. Glucose level was monitored via the tail before and 15, 30 and 60 min after insulin administration. Animals were re-fed after the test.

Pyruvate dehydrogenase assay

Active pyruvate dehydrogenase (PDH) activity was determined by measuring the $^{14}\text{CO}_2$ production from [$1\text{-}^{14}\text{C}$]-pyruvate according to the method described by Van Laack et al. [30], with modifications. Tissue extracts were prepared by manually homogenizing 15 mg of frozen and powdered skm into 300 μ l of buffer, composed of 250 mM sucrose, 2 mM EDTA, 100 U/ml heparin and 10 mM Tris (pH 7.4), using 20 to 25 strokes of a glass pestle. The homogenate was centrifuged for 10 min at 800 g and the supernatant was collected. Twenty-five μ l of tissue extracts were preincubated at 37 °C with 25 μ l of an assay mixture containing 400 mM Tris-HCl (pH 7.8), 2 mM EDTA, 8 mM MgCl_2 , 3 mM TPP, 2 mM NAD, 8 mM CoA, 4 mM L-carnitine, 80 μ M cytochrome c, 20 mM β -mercaptoethanol, 4 mM Na_2SO_3 and 5 μ l neonatal calf serum. After 10 min of preincubation, 25 μ l of 2 mM [$1\text{-}^{14}\text{C}$]-pyruvate (0.7 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) was added and the

reaction continued at 37°C for 15 min in tubes placed in closed vials. The reaction was stopped by injecting 200 μ l of 20% trichloroacetic acid into the tubes. The $^{14}\text{CO}_2$ released was trapped in 1 cm^2 filter papers, soaked with 0.5 M NaOH and stuck to the vial wall, for 30 min. The radioactivity in filter papers was counted, in a liquid scintillation counter, and values corrected for protein concentration, as measured with a Pierce BCA protein assay kit, to calculate PDH activity. To examine the levels of phosphorylated PDH-E1 α subunit at sites 1 and 2, aliquots of tissue extracts (25 μ g of protein) were analysed by western blotting.

Assay of substrate oxidation in isolated gastrocnemius muscle strips

Two to 3 strips of mouse gastrocnemius muscle (total of 50 to 60 mg) were dispensed into plastic vials and incubated during 4 h (37°C, 5% CO_2) in 2.5 ml of glucose-depleted DMEM medium containing either 10 mM glucose added with [$U\text{-}^{14}\text{C}$]glucose (0.21 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) (Amersham Biosciences, Barcelona, Spain), 0.5 mM palmitate added with [$1\text{-}^{14}\text{C}$]palmitate (2.8 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) (Amersham Biosciences) or 2 mM β -hydroxybutyrate added with p-[$3\text{-}^{14}\text{C}$]hydroxybutyrate (0.2 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) (NEN Research Products, DuPont, Boston, USA). An aliquot of 10 μ l of the incubation media was taken before and at the end of muscle strips incubation, and was counted for radioactivity in scintillation cocktail (Ecoscint H, National Diagnostics, East Riding of Yorkshire, UK) to estimate substrate utilization rate during the incubation period. The incubation was terminated by addition of 750 μ l of 3 M HClO_4 per vial. Immediately, a Whatman #3 paper soaked with 125 μ l β -phenylethylamine was placed hanging in a basket in each vial tightly sealed with a silicone cap. After 1 h of incubation the filter paper was harvested and the trapped $^{14}\text{CO}_2$ counted in scintillation cocktail. In muscle strips incubated with [$1\text{-}^{14}\text{C}$]palmitate, [^{14}C]acid-soluble intermediate metabolites were determined by harvesting 200 μ l of incubation media added with HClO_4 , centrifuging this at 13000 g for 5 min (to discard acid insoluble long-chain fatty acids), collecting 100 μ l of the resulting supernatants (containing oxidized fatty acid intermediate metabolites) and measuring the radioactivity of these in scintillation cocktail.

Statistical analysis

Data are presented as means \pm SEM or SD. The significance of differences was analyzed by Student's t test. Differences were considered significant at $p < 0.05$. Student's t test was applied to the subgroups defined by gene delivery, gender and diet; or was applied to the groups defined by one condition, such as gene delivery, when no significant differences were observed within the other conditions, such as gender and/or diet.

Results

Mitochondrial localization of FATP1 protein in mouse skm and cultured C2C12 muscle cells

We have previously reported that endogenously expressed FATP1 in cultured human and C2C12 muscle cells is present in mitochondria-enriched fractions and not in the cytosolic fraction [12]. Here, we examined by immunoblotting the distribution of endogenous FATP1 protein in subcellular fractions of skm from adult mice fed a normal diet obtained by sequential centrifugation (Figure 1A). VDAC and MTCO1 were used as mitochondrial markers, GAPDH as a cytoplasmic predominant protein and GLUT1 as a plasma membrane predominant protein. As shown in Figure 1A, FATP1 (about 71 kDa) was detected in the 1500 g pellets, which are enriched in large mitochondria [24], and not in

the 10000 *g* pellets, which are enriched in mitochondria and other organelles, or in the 10000 *g* supernatant fraction. The FATP1 distribution was equivalent to that of the mitochondrial marker VDAC [31]. It was however different from that of MTCO1, a component of the respiratory electron transport chain of mitochondria, which was present (observed size 37 kDa) in both 1500 *g* and 10000 *g* pellets, but predominant in the 10000 *g* pellet. FATP1 distribution differed from that of GAPDH, which is known to be localized mainly in cytoplasm, although it can also be found in particulate fractions, such as the nucleus, the mitochondria, and the small vesicular fractions [32]. FATP1 distribution differed from that of GLUT1, which was present in the 10000 *g* supernatant fraction. Therefore, these data showed the preferential distribution in the mouse skm mitochondrial fractions of the endogenous FATP1 protein.

Then, we applied a density gradient centrifugation technique to purify mitochondria from the mitochondrial pellet. The analysis of FATP1 protein presence in purified mitochondria is shown in Figure 1B. FATP1 was strongly detected in purified mitochondria and hardly detected in the mitochondrial pellet supernatant. The purity of mitochondria was highlighted by the lack of staining with the endoplasmic reticulum resident oxidoreductase chaperone PDI and plasma membrane marker GLUT1, in opposition to the marked presence of mitochondrial proteins such as VDAC, MTCO1 and OXCT1. PDI and GLUT1 were shown in the supernatant of the mitochondrial pellet, even though mitochondrial proteins VDAC and MTCO1 were also detected in this fraction.

Purified mitochondria were then treated with digitonin, to remove outer membranes, followed by differential centrifugation to separate three fractions enriched in: the outer membrane, the soluble proteins (including proteins localized between the membranes plus some solubilized outer membrane) or the inner membrane plus matrix [26]. FATP1 appeared in the outer membrane and soluble fraction (despite the latter contained about

3-fold less protein than the other two submitochondrial fractions), but not in the inner membrane plus matrix fraction (Figure 1B). The distribution pattern of VDAC, a protein known to be localized on the outer mitochondrial membrane, was similar with predominance in the outer membrane and soluble fractions; although a signal was present in the inner membrane plus matrix fraction. In contrast, the mitochondrial matrix enzyme OXCT1 and the mitochondrial-encoded MTCO1, which is localized within the mitochondrial inner membrane, were most abundant in the inner membrane plus matrix enriched fraction; although they were also detected in the other two fractions, mainly the soluble one.

We then examined FATP1 presence in a membrane fraction (plasma membrane and microsomes) obtained by ultracentrifugation of the mitochondrial pellet supernatant. As shown in Figure 1B, FATP1 was detected in this part. The endoplasmic reticulum marker PDI and the plasma membrane protein GLUT1 were most abundant in this fraction as expected. VDAC, which has been demonstrated to have also a plasma membrane localization [33], was shown at a considerable level. A very low proportion of MTCO1 and no signal for the mitochondrial matrix protein OXCT1 was observed.

Previously, applying fluorescence microscopy we showed that transfected FATP1-GFP colocalized with mitochondrial markers in C2C12 [12] and L6E9 [13] cells. Here, to achieve higher resolution in the study of the subcellular localization of FATP1 in muscle cells, we performed an immunocytochemical analysis of the transfected FATP1-GFP or GFP encoded proteins in C2C12 muscle cells with an anti-GFP antibody by electron microscopy (Figure 2). This showed that the FATP1-GFP protein was localized in the mitochondria in C2C12 myotube sections (Figure 2a,b), in addition to other cytoplasmic locations. In contrast, the GFP protein (Figure 2c) was mainly localized in the Golgi complex and it was present inside the nuclei, but not found within mitochondria.

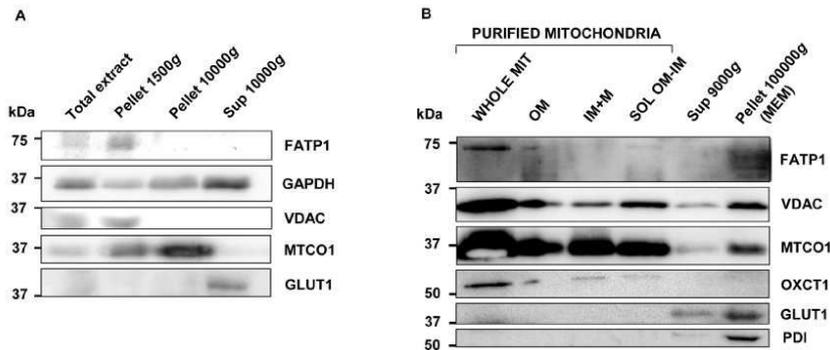


Figure 1. FATP1 protein is localized in mitochondria in gastrocnemius muscle. Gastrocnemius muscle samples of adult control mice were used and western blot analyses were performed on tissue extracts. (A) Thirty μ g of protein of total extracts, pellets after centrifugation at 1500 *g* and 10000 *g* or the supernatant (sup) of the 10000 *g* pellet. (B) Extracts from purified mitochondria, namely whole mitochondria (WHOLE MIT) (20 μ g of protein), subfractions of outer membrane (OM) (10 μ g of protein), inner membrane plus matrix (IM+M) (10 μ g of protein) and soluble intermembrane protein (SOL OM+M) (3 μ g of protein); the 9000 *g* supernatant of pelleted mitochondria (20 μ g of protein) and the 10000 *g* pellet membrane (MEM) of the 9000 *g* supernatant (20 μ g of protein). Membranes were hybridized with antibodies against FATP1, VDAC, MTCO1, GAPDH, OXCT1, GLUT1 or PDI as indicated. Representative images are shown.
doi:10.1371/journal.pone.0098109.g001

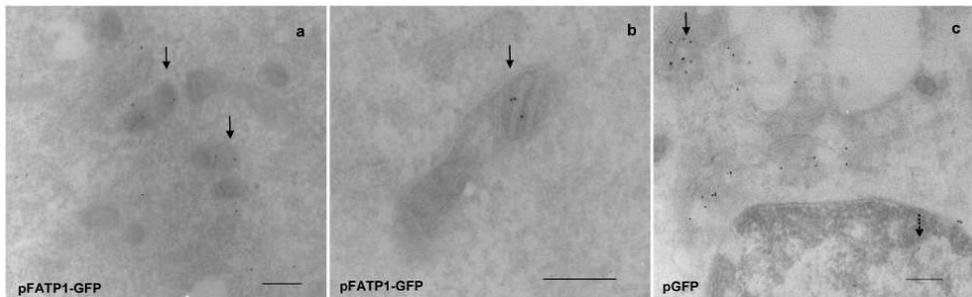


Figure 2. Electron microscopic localization of FATP1-GFP in C2C12 myotubes. C2C12 myoblasts were transfected with (a,b) pFATP1-GFP or (c) pGFP (control), and induced to differentiate into myotubes. Four days post-transfection, myotubes were fixed, gelatin blocks mounted and sections were prepared in an ultracyromicrotome, incubated with anti-GFP antibody and analyzed by electronic microscopy. (a,b) Image of FATP1-GFP localized inside the mitochondria (see arrows); (c) image of GFP localized in the Golgi complex (see continuous arrows) and nuclei (dotted arrow). The observations were made in an electron microscope with a CCD camera and an electron accelerating voltage of 80 Kv was employed for the measurements. Bar represents 200 nm. doi:10.1371/journal.pone.0098109.g002

Adenovirus-mediated FATP1 overexpression in mouse gastrocnemius muscle

To bring new insight into the impact of skm FATP1 on metabolic control, the FATP1 or the GFP coding sequences were delivered into newborn mice by intramuscular injection of adenovirus Ad-FATP1 (FATP1-mice), or Ad-GFP (GFP-mice), into both hind legs (to maximize the whole body metabolic impact). After weaning, GFP- and FATP1-mice were fed a chow or high-fat diet. Recombinant adenovirus is a widely used delivery vector for both gene therapy and functional studies [34]. Adenovirus gene delivery, by injection into hindlimbs of immunologically naive newborn rodents, results in skeletal muscle-specific expression of the transgene [35], and persistent transgene expression [36–38], up to 8 months after gene delivery [37]. Here, upon completion of the study (15- to 16-week-old mice), FATP1 mRNA levels were determined in gastrocnemius muscles. No gender differences were observed in the expression of the endogenous FATP1 gene in chow-fed GFP-mice (data not shown). FATP1 mRNA content in female GFP-mice was higher (2.1-fold) in those maintained on a high-fat diet compared to those (male and female) fed chow (Figure 3A). FATP1 mRNA levels were increased in FATP1-mice compared to GFP-mice in both chow (3.8-fold) and high-fat (6.9-fold) diet subgroups. FATP1 protein content was also increased in gastrocnemius of FATP1-mice compared to GFP-mice (Figure 3B). No increased FATP1 mRNA levels were observed in soleus and tibialis anterior muscles from FATP1- compared to GFP-mice (data not shown).

It has already been shown that injection of adenovirus into hindlimbs of newborn rats results in restricted expression of the transgene in the injected muscle [35]; however, since it is known that adenoviruses have a liver tropism after entering the bloodstream [35,39], we measured hepatic FATP1 mRNA levels in FATP1- and GFP-mice. We found that FATP1 mRNA levels were undetectable in the liver of both FATP1- and GFP-mice (females fed a chow diet). Therefore, we conclude that as expected FATP1 gene delivery was confined to hindlimb muscles and that no systemic distribution had occurred, which would have resulted in the hepatic expression of FATP1.

Effects of FATP1 delivery to skm on blood circulating glucose and lipid metabolites and insulin in mice fed a chow or high-fat diet. Whole-body glucose and insulin tolerance

Upon completion of the study, body weight was similar in FATP1- and GFP-mice, in any of the defined gender or diet subgroups (Table 1). However, as expected, administration of the high-fat diet to females increased body weight in comparison with the chow diet, and females had a lower body weight than males on chow.

At this time, blood fed glucose did not differ between FATP1- and GFP-mice maintained on chow (Table 1). The high-fat diet increased glucose levels in control female mice compared to those fed chow and this effect was not observed in FATP1-mice, however no significant differences were observed between high-fat diet fed FATP1- and GFP-mice. Serum fed insulin and triglyceride levels did not differ between FATP1- and GFP-mice maintained on either chow or high-fat, there were no gender differences, nor did FATP1 exert any effect in mice grouped irrespective of diet and gender (Table 1). Moreover, the high-fat diet had no significant effect on either insulin or triglycerides, presumably due to the fact that mice were fed either diet just after weaning for a limited period of 12 to 13 weeks.

Remarkably, in the FATP1- compared to the GFP-mice grouped irrespective of diet and gender, serum fed fatty acid levels were lower, and diet had no significant effect. Since fatty acid catabolism is interrelated to ketone body metabolism, we thus assessed ketonemia, which can be determined by measuring the levels of β -hydroxybutyrate that accounts for approximately 75% of the ketone bodies in serum and during ketosis increases even more than the other two ketoacids, acetoacetate and acetone [40]. We found that β -hydroxybutyrate levels were higher in FATP1- versus GFP-mice, whereas diet and gender had no significant effect (Table 1). Changing tendencies, i.e. about 1.9- to 3.6-fold increment for β -hydroxybutyrate, which did not reach statistical significance, were observed for each of the FATP1-mice subgroups defined by gender or diet relative to mated GFP-mice.

No differences were observed between FATP1- and GFP-mice for fasted blood glucose levels in either diet conditions (Figure 4A). Moreover, no differences in glucose tolerance were associated with

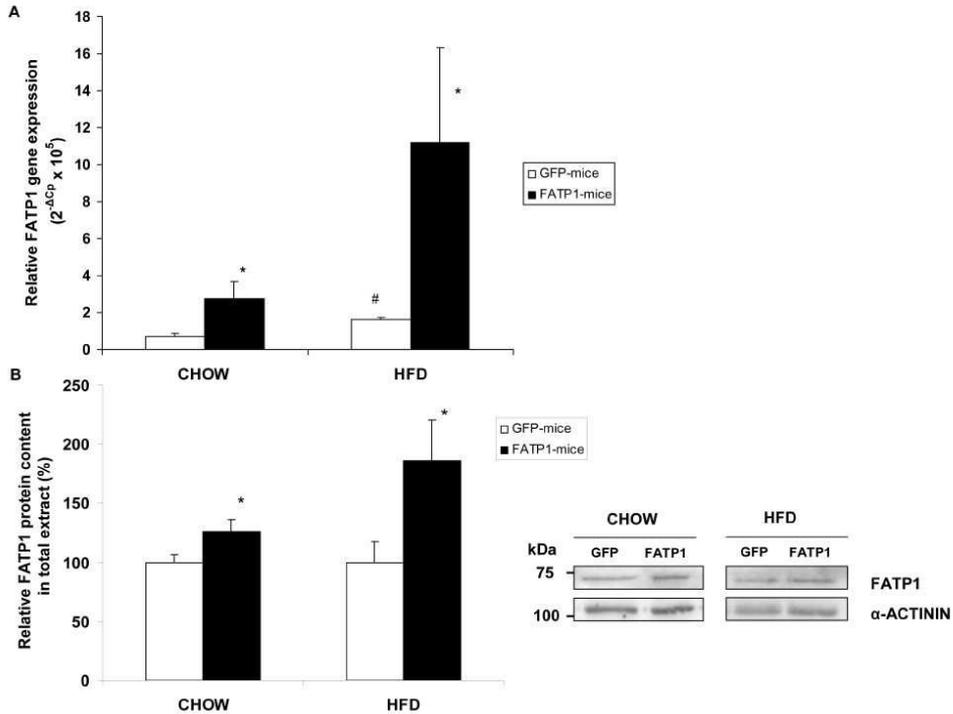


Figure 3. Overexpression of the FATP1 gene in mouse gastrocnemius muscle. (A) The FATP1 mRNA levels relative to *Rn18s*, and (B) the FATP1 protein levels relative to α -actinin, were analyzed in the gastrocnemius muscles (right and left) of GFP- and FATP1-mice fed a chow diet (males and females) or a high-fat diet (HFD) (females). (A) Data are mean values of $2^{-\Delta C_p} \times 10^5 \pm$ SEM from nine to sixteen samples performed in duplicate. (B) A representative image is shown and bands were quantified. Data is the ratio of intensities of bands expressed as a percentage of control and is the mean \pm SEM of five samples performed in duplicate. The significance of the Student's t test is: # $p < 0.01$ GFP-females fed a HFD versus GFP-mice (male and female) fed a chow diet; and * $p < 0.05$ FATP1- versus GFP-mice within the same diet condition. doi:10.1371/journal.pone.0098109.g003

FATP1 overexpression in animals fed chow or high-fat (Figure 4A), even though glucose tolerance was impaired by the high-fat diet, as shown by the elevated area under the curve for glucose within both FATP1- and GFP-mice (Figure 4B). Whole-body insulin tolerance was also unaffected by FATP1 gene delivery in either chow- or high-fat-fed females (data not shown).

Triglyceride skm accumulation is reduced by delivery of FATP1 in mice

To test the effects of FATP1 on triglyceride tissue accumulation, triglyceride content was quantified in the gastrocnemius muscle, liver and white adipose tissue in mice fed a chow or high-fat diet (Table 2). In gastrocnemius muscle, triglyceride content was unaffected by diet and gender, and it was lower in the FATP1-mice group compared to GFP-mice group irrespective of diet and gender. No changes due to FATP1 overexpression were observed in the liver or white adipose tissue triglyceride content, in any of the studied gender or diet subgroups or irrespective of these conditions. However, as anticipated, feeding females a high-fat diet increased the triglyceride content in the liver and adipose

tissue. In addition, gender differences were observed in chow-fed mice.

Regulation of *Hmgcs2* and *Oxct1* expression in mouse skm by FATP1 overexpression

An analysis was conducted to assess whether higher levels of circulating ketone bodies in FATP1-mice were linked to the regulation of key genes of ketone body metabolism, in skm. We explored the mRNA levels of *Hmgcs2* encoding the mitochondrial protein 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2 (HMGCS2), which is the rate-limiting enzyme of ketogenesis using as primary substrates acetoacetyl-CoA and acetyl-CoA; and those of *Oxct1* encoding the mitochondrial protein succinyl-CoA:3-oxoacid-CoA transferase (SCOT/OXCT1), an enzyme that reversibly catalyzes the conversion between acetoacetate and acetoacetyl-CoA and can mediate ketone body oxidation and also ketogenesis [41]. We found that *Hmgcs2* mRNA levels (Figure 5A) were similar in the gastrocnemius muscle of chow-fed FATP1- and GFP-mice. However, *Hmgcs2* expression was enhanced by the high-fat compared to chow diet in GFP-mice, and this rise was

Table 1. Body weight, blood metabolites and insulin levels in GFP- and FATP1-mice.

	CHOW DIET				HIGH-FAT DIET			
	GFP-males	FATP1-males	GFP-females	FATP1-females	GFP-females	FATP1-females	GFP-mice	FATP1-mice
Body weight (g)	29.9±1.0	29.8±1.1	24.4±1.5 [#]	24±1.1 [†]	30.4±1.4 [†]	29.4±1.7 [†]	-	-
Glucose (mg/dl)	120±5	133±8	111±6	115±5	141±7	127±6±6	-	-
Insulin (ng/ml)	0.79±0.18	0.80±0.12	0.66±0.27	0.62±0.29	1.02±0.34	1.07±0.21	0.86±0.17	0.89±0.12
Triglycerides (mmol/l)	0.30±0.05	0.36±0.04	0.45±0.09	0.45±0.08	0.61±0.22	0.46±0.07	0.48±0.09	0.43±0.04
Fatty acids (mmol/l)	0.20±0.09	0.04±0.03	ND	ND	0.32±0.12	0.07±0.06	0.25±0.07	0.06±0.03 [†]
β-Hydroxybutyrate (mmol/l)	0.18±0.13	0.34±0.23	0.32±0.10	1.16±0.49	0.19±0.05	0.48±0.24	0.21±0.04	0.62±0.18 [†]

Body weight, blood glucose, serum insulin, triglyceride, fatty acid and β-hydroxybutyrate levels were measured in *ad libitum* fed either diet GFP- or FATP1-mice at 15- to 16-weeks of age. Data are means ± SEM of at least five samples. The significance of the Student's t test is: [†]p<0.05 females fed a high-fat versus chow diet; [#]p<0.01 GFP-females fed a high-fat versus chow diet; ^{††}p<0.05 GFP-females versus GFP-males fed a chow diet; ^{†††}p<0.005 FATP1-females versus FATP1-males fed chow; and ^{††††}p<0.05 FATP1-mice versus GFP-mice irrespective of diet and gender. ND means not determined. doi:10.1371/journal.pone.0098109.t001

abolished following FATP1 gene delivery. Nevertheless, no differences in HMGCS2 protein content between high-fat diet fed GFP- and FATP1-mice were observed (Figure 5B). *Oxdl* mRNA levels (Figure 5C) were slightly and significantly upregulated by FATP1 in the gastrocnemius muscle of the chow-fed female group, but not in the high-fat-fed group compared to mated GFP-mice. The high-fat diet did not change *Oxdl* expression in skm, however, and as previously described [42], it reduced *Oxdl* mRNA levels (3.5-fold, p<0.05) in the heart of control mice. OXCT1 protein levels were not changed by FATP1 overexpression in either diet condition (Figure 5D).

Overexpression of FATP1 does not change β-hydroxybutyrate levels in mouse skm and liver

We then determined whether overexpression of FATP1 in skm and the associated increase in circulating β-hydroxybutyrate was accompanied by altered levels of β-hydroxybutyrate in either skm or liver in mice fed a high-fat-diet. In the gastrocnemius muscle, and tibialis anterior (in which FATP1 was not overexpressed), β-hydroxybutyrate levels were not changed in FATP1- versus GFP-mice (Table 3); nor did β-hydroxybutyrate levels in the liver differ between these two mouse groups (Table 3). In addition, no differences in β-hydroxybutyrate content in the liver of chow-fed female mice were associated with FATP1 gene delivery (GFP-mice 1.08±0.10 nmol/mg wet weight and FATP1-mice 1.10±0.09 nmol/mg wet weight). Nevertheless, as expected hepatic levels of β-hydroxybutyrate were lower (p<0.01) in female mice fed chow versus high-fat irrespective of GFP or FATP1 condition, reflecting the ketogenic effect of the high-fat diet.

Regulation of active PDH levels and *Pdk4* expression in mouse skm by FATP1 overexpression

We have previously shown [12] that FATP1 overexpression, in cultured muscle cells, activates PDH, which is a rate-limiting step in glucose oxidation [43]. We therefore tested whether FATP1 regulated PDH activity in mouse skm (Figure 6A). We found that, in chow-fed female mice, the levels of the active form of the PDH complex were unchanged by FATP1 overexpression. Feeding with a high-fat diet reduced by 9.8-fold the activity of the active form of PDH in control mice, and FATP1 overexpression lessened this reduction although did not reach statistical significance. The PDH complex is formed by three catalytic components, namely pyruvate decarboxylase (E1, a tetramer of 2α and 2β subunits), dihydrolipoamide acetyltransferase (E2) and dihydrolipoamide dehydrogenase (E3), together with the E3-binding protein (E3BP). PDH-E1 is the rate-limiting step in the PDH complex and its activity is negatively regulated by phosphorylation of the E1α subunit at three phosphorylation sites: site 1 (Ser²⁶⁴), site 2 (Ser²⁷¹) and site 3 (Ser²⁰³) [43]. We analysed the levels of phosphorylated PDH-E1α at sites 1 and 2 relative to α-actinin (Figure 6B). We found that the content of phosphorylated PDH-E1α subunit at site 2 was significantly increased by the high-fat diet in control mice, whereas no significant change was observed at site 1. The diet-induced increase in the level of phosphorylated PDH-E1α at site 2, toward which pyruvate dehydrogenase kinase (PDK) 4 exhibits a much higher activity compared to PDK1, PDK2 and PDK3 [43], was correlated to the reduction in active PDH. However, to confirm this regulation the ratio of phosphorylated versus total PDH-E1α should be determined. On the other hand, changes in the phosphorylation of PDH-E1α sites 1 and 2 are not consistently reflected in active PDH activity changes in muscle and the participation of other covalent undefined modifications has been suggested [28]. No significant effect of FATP1 was observed in the

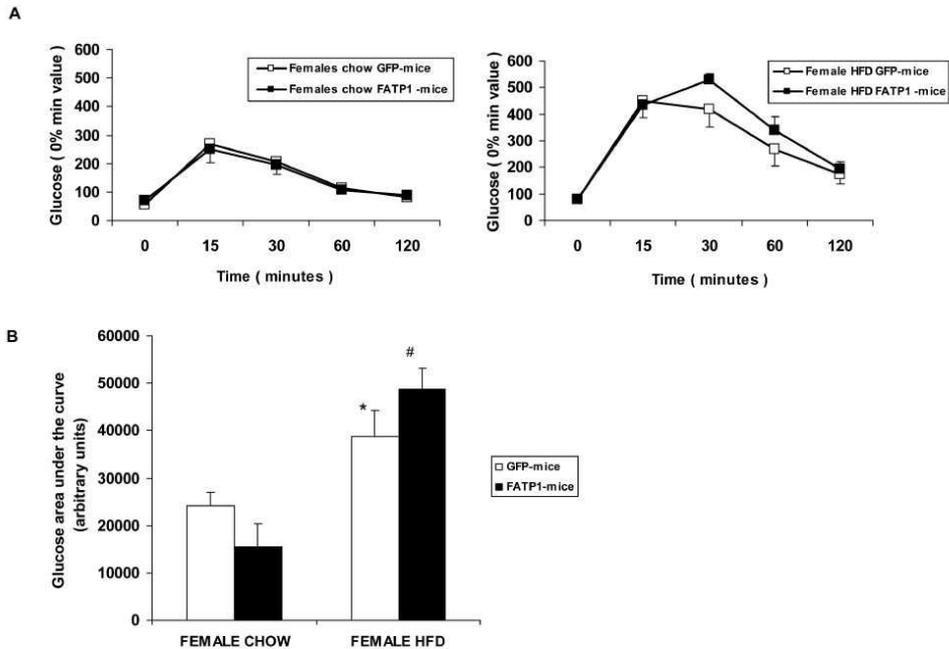


Figure 4. Glucose tolerance tests in GFP- and FATP1-mice. Blood glucose levels were measured before (0 min) and after glucose injection, several times up to 120 min, in GFP- or FATP1-mice fed as stated, chow or a high-fat diet (HFD). (A) Glucose data are shown and are means \pm SD of five animals. (B) Glucose areas under the curve are shown and are means \pm SD of five animals. The significance of the Student's t test is: * $p < 0.05$ and # $p < 0.001$ within FATP1- or GFP-mice fed a HFD versus chow. doi:10.1371/journal.pone.0098109.g004

phosphorylation of PDH-E1 α at sites 1 and 2 in chow-fed mice, even though the high-fat diet-induced increase in site 2 phosphorylation tended to be attenuated in FATP1-mice, in association with a less pronounced fall in PDH activity.

We also analyzed whether pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4) mRNA levels in mouse skm were altered by FATP1. There was no change in *Pdk4* expression due to FATP1 gene delivery in mice fed a chow diet, both when separated by gender (Figure 6C) or grouped together (data not shown). However, the high-fat diet upregulated *Pdk4* mRNA levels and FATP1 overexpression partially counteracted this increase (Figure 6C).

Oxidative disposal of palmitate and β -hydroxybutyrate is altered by FATP1 overexpression in mouse skm

Our data suggested that FATP1 overexpression in gastrocnemius muscle could alter the oxidative disposal of fatty acids and ketone bodies. To test this, we electropored pFATP1 or pGFP plasmids into the gastrocnemius muscle of mice. Ten days after transfection, gastrocnemius muscle strips were obtained. Increased FATP1 protein content was shown in muscle strips from mice electropored with pFATP1 in comparison to pGFP-electropored mice, in both total extracts (2.8-fold) and the 1500 g pellet fraction enriched in mitochondria (2.4-fold), suggesting that the transfected protein mimics the endogenous protein localization (Figure 7A). In isolated muscle strips, the rate of oxidation and utilization of

radioactively labelled 0.5 mM palmitate, 2 mM β -hydroxybutyrate or 10 mM glucose was determined (Figure 7B). FATP1 overexpression increased by 19% [$1\text{-}^{14}\text{C}$]palmitate oxidation to $^{14}\text{CO}_2$ (rate in controls 0.88 ± 0.04 pmol/mg tissue \times h). The production of $^{14}\text{CO}_2$ from [$3\text{-}^{14}\text{C}$] β -hydroxybutyrate was, in contrast, reduced by 27% (rate in controls 5.43 ± 0.60 pmol/mg tissue \times h) and that from [$U\text{-}^{14}\text{C}$]glucose unchanged (rate in controls 9.64 ± 1.55 pmol/mg tissue \times h). The production of [^{14}C]acid-soluble intermediate metabolites due to incomplete [$1\text{-}^{14}\text{C}$]palmitate oxidation (including acetyl-CoA, acetyl-carnitine, intermediates of Krebs cycle and ketone bodies) was unchanged by FATP1 (rate in controls 89.2 ± 1.4 pmol/mg tissue \times h). Finally, no significant changes were observed in the consumption of either substrate [$1\text{-}^{14}\text{C}$]palmitate (5.52 ± 0.21 nmol/mg tissue \times h in controls), p-[$3\text{-}^{14}\text{C}$]hydroxybutyrate (10.9 ± 0.7 nmol/mg tissue \times h in controls) or [$U\text{-}^{14}\text{C}$]glucose (62.6 ± 7.1 nmol/mg tissue \times h in controls), even though a reduction tendency was observed for the ketone body and glucose. In control gastrocnemius (pGFP-electropored), the ratio of $^{14}\text{CO}_2$ production to labelled substrate consumption was about 3-fold greater for the ketone body than for palmitate and glucose, in accordance to the more diversified metabolism of the latter two substrates.

Table 2. Triglyceride levels in skm, liver and adipose tissue of GFP- and FATP1-mice.

TRIGLYCERIDES	CHOW DIET			HIGH-FAT DIET		
	GFP-males	FATP1-males	GFP-females	FATP1-females	GFP-females	FATP1-females
Gastrocnemius(nmol/mg prot)	75.2±12.3	47.7±5.1	76.6±11.9	62.8±15.2	74.1±12.1	56.5±7.2
Liver(nmol/mg prot)	83.8±20.9	83.3±11.4	143±18*	153±22#	385±39††	391±36##
White adipose tissue (µmol/mg prot)	4.18±0.54	3.26±0.47	1.42±0.11**	1.49±0.16#	2.77±0.49†	2.58±0.35‡

Triglyceride levels were measured in extracts from the gastrocnemius muscle, liver and white adipose tissue of *ad libitum* fed GFP- or FATP1-mice. Data are means ± SEM of at least four samples. The significance of the Student's t test is: *p<0.05 and †p<0.001 female versus male GFP-mice fed chow; #p<0.01 female versus male FATP1-mice fed chow; †p<0.05 and ††p<0.001 female FATP1-mice fed high-fat versus chow; #p<0.05 and ##p<0.001 female FATP1-mice fed high-fat versus chow; and †p<0.05 FATP1- versus GFP-mice irrespective of diet and gender. doi:10.1371/journal.pone.0098109.t002

Discussion

FATP1 is considered a mediator of fatty acid import in skm, but its prevailing intracellular localization remains under debate. Our results strengthen the evidence for its mitochondrial localization, in both skm tissue and cultured cells. We show that, in mouse skm, the endogenous FATP1 protein was mostly present in mitochondrial tissue fractions and in purified mitochondria; and that transfected FATP1 increased FATP1 protein content in mitochondrial fractions. A previous study, in isolated mouse soleus muscle, revealed a marked intracellular localization of the endogenous FATP1 protein in a vesicle population that was not defined [14]. However, no support for the mitochondrial localization was obtained in FATP1-transfected rat muscle, in which there was no increase in FATP1 protein on mitochondria [16]. Moreover, by applying digitonin followed by differential centrifugation to purified mitochondria, we provide insight into FATP1 submitochondrial localization. FATP1 was detected in the outer membrane and intermembrane fractions rather than in the inner membrane plus matrix fraction. Considering that FATP1 is an integral membrane protein with one transmembrane domain [4], we suggest that it may be an integral outer membrane protein. Finally, using immunocytochemical localization via immunogold electron microscopy, we provide herein evidence for the mitochondrial localization of the FATP1-GFP protein in C2C12 muscle cells. Consistent with our results here, the endogenous FATP1 protein in murine and human cultured skm cells is present in mitochondria-enriched fractions [12], and the fusion protein FATP1-GFP colocalizes with mitochondrial markers in C2C12 [12] and L6E9 [13] muscle cells. Indeed, a bioinformatic analysis predicts FATP1 import into mitochondria, as well as that of two other members of the FATP family, FATP2 and FATP4; and using protein cross-linking, a number of mitochondrial and mitochondrially associated proteins that bind FATP1 in 3T3-L1 adipocytes have been identified [9]. It should be noted however, that the mitochondrial localization of FATP1 in adipocytes remains controversial, since no significant overlap of FATP1 with mitochondria was observed in another study [10]. On the other hand, we show that FATP1 was also present in an enriched plasma membrane fraction from mouse gastrocnemius muscle, consistent with the description of its localization in sarcolemma of lower hindlimb rat muscles [14,15] and plasma membrane of 3T3-L1 adipocytes [3,6,7]. This type of dual distribution has been observed for VDAC, which is an abundant protein in the outer mitochondrial membrane, but is also present in the plasma membrane [33].

The differential effect of FATP1 overexpression on fatty acid metabolism has been reported in cultured skm cells, in which it consistently promotes fatty acid diversion towards triglyceride storage [11,13], and in mouse skm tissue, in which FATP1 targets fatty acids to oxidation but not triglyceride accumulation [16]. To gain further insight into skm FATP1 biochemical role *in vivo*, we used adenovirus to deliver the FATP1 gene into hindlimb muscles of mice that were then fed a chow or a high-fat diet after weaning. Mouse body weight was not altered by FATP1 overexpression in either feeding condition; consistently with the lack of effect on body weight that is observed in muscle-specific FATP1-overexpressing transgenic mice compared to wild-type mice, fed either a chow or a high-fat diet [16]. Serum fed triglycerides levels were unchanged in FATP1- compared to GFP-mice regardless of diet; however, fatty acid levels were reduced and β -hydroxybutyrate levels were increased. The enhanced systemic fatty acid disposal in FATP1-mice is concordant with the proven capacity of overexpressed FATP1 to mediate fatty acid uptake, as shown in cultured

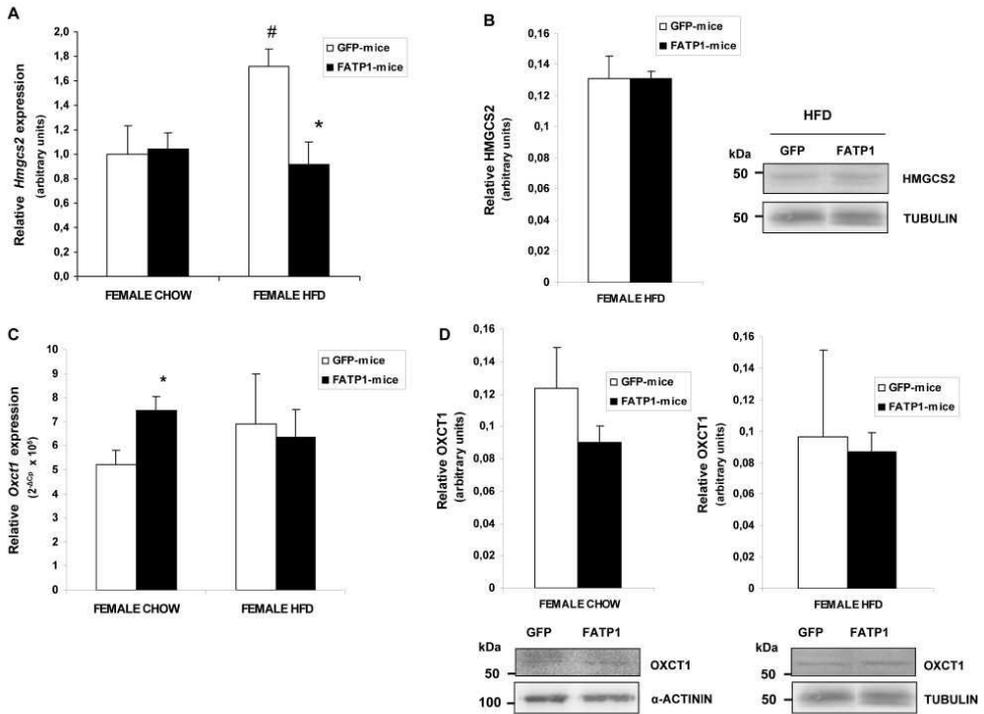


Figure 5. Muscle *Hmgcs2* and *Oxt1* expression in GFP- and FATP1-mice. (A) The *Hmgcs2* mRNA levels relative to *Actb* and (C) *Oxt1* mRNA levels relative to *Rn18s* were analyzed in the gastrocnemius muscles of GFP- and FATP1-female mice fed a chow or high-fat diet (HFD). (A,C) The significance of the Student's t test is: * $p < 0.05$ FATP1- versus GFP-female mice fed on the same diet; # $p < 0.05$ control mice fed a HFD versus chow. *Hmgcs2* data are mean values of $2^{-\Delta Ct} \pm SEM$ in arbitrary units from four to six samples performed in duplicate. *Oxt1* data are mean values of $2^{-\Delta Ct} \times 10^3 \pm SEM$ from four to six samples performed in quadruplicate. (B) The HMGS2 and (D) OXCT1 protein levels relative to tubulin or α -actinin levels were analysed. A representative image is shown and bands were quantified. Data is the ratio of intensities of bands expressed as a percentage of control and is the mean \pm SEM of at least four samples performed in duplicate. doi:10.1371/journal.pone.0098109.g005

skm cells [11] and tissue [16]. Here, intramuscular triglyceride levels were reduced by FATP1 overexpression irrespective of diet, and there were no diet-associated changes, as already observed in rat muscle [44]. Our data diverge from that in muscle-specific FATP1-overexpressing transgenic mice [16], which show unaltered non-fasting serum triglyceride and NEFA levels compared to wild-type mice, before or after a high-fat diet, and unaltered

intramuscular triglyceride content on a high-fat diet. We suggest that this differential lipid metabolic pattern may be due to distinct metabolic adaptations to muscle-directed transgenic versus skm-directed adenoviral postnatal gene transfer of FATP1. On the other hand, in our FATP1-mice, triglyceride content in both the liver and white adipose tissue was unchanged compared to GFP-mice, indicating no redistribution of tissue triglyceride stores.

Table 3. β -hydroxybutyrate levels in skm and liver of high-fat diet fed GFP- and FATP1-mice.

β -HYDROXYBUTYRATE(nmol/mg wet weight)	GFP	FATP1
Gastrocnemius	0.80 \pm 0	1.10 \pm 0.22
Tibialis	1.32 \pm 0.04	1.37 \pm 0.05
Liver	1.31 \pm 0.05	1.54 \pm 0.12

β -hydroxybutyrate levels were measured in extracts from the gastrocnemius and tibialis anterior muscle and the liver of GFP- and FATP1-female mice fed high-fat. Data are mean values \pm SEM from four to five samples. doi:10.1371/journal.pone.0098109.t003

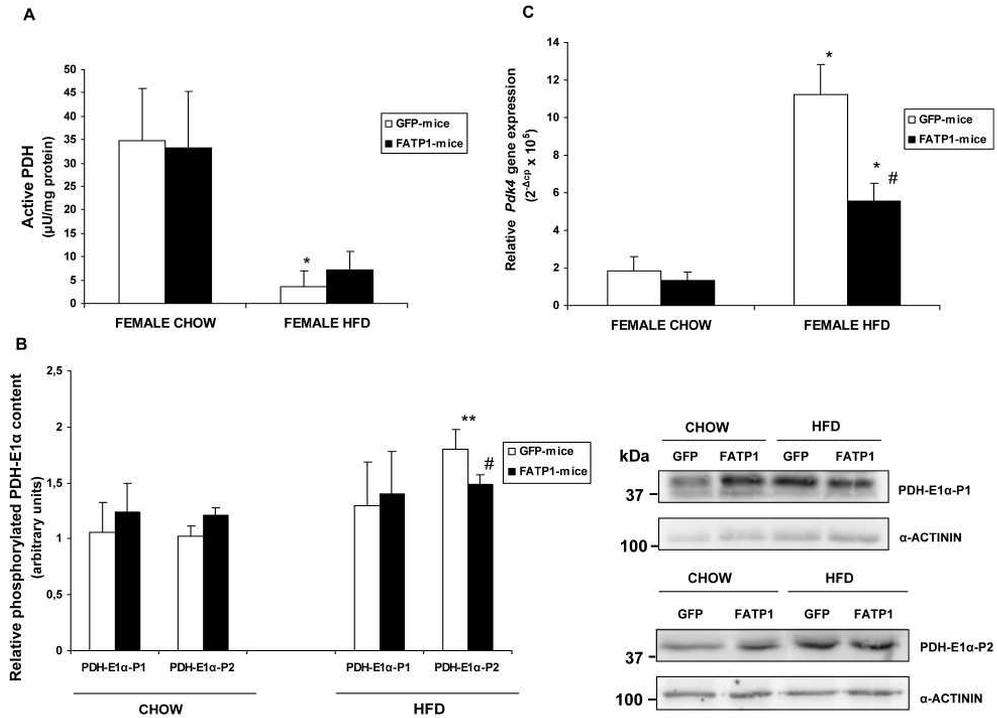


Figure 6. PDH levels and *Pdk4* expression in skm of GFP- and FATP1-mice. (A) Active PDH levels and (B) levels of phosphorylated PDH-E1 α at sites 1 (P1) and 2 (P2) relative to α -actinin levels, were measured in extracts from the gastrocnemius muscle of GFP- and FATP1- female mice fed a chow or high-fat diet (HFD). Data are mean values \pm SEM from at least four samples. The significance of the Student's t test is * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ in GFP-mice fed a high-fat versus chow diet; and # $p < 0.05$ FATP1-mice fed high-fat versus FATP1-mice fed chow (C) *Pdk4* expression was analyzed in the gastrocnemius muscle of female GFP- and FATP1-mice fed as indicated. Data are mean values of $2^{-\Delta\Delta C_t} \times 10^5 \pm$ SEM from four to eight samples performed in duplicate. The significance of the Student's t test is: * $p < 0.01$ in mice fed high-fat versus chow within the same GFP- or FATP1-condition; and # $p < 0.05$ FATP1-mice versus GFP-mice fed high-fat. doi:10.1371/journal.pone.0098109.g006

These data contrast with that reported for the abrogation of FATP1 in mice, which causes a redistribution of lipids from adipose and muscle tissue to the liver, in both high- and low-fat-fed animals [14], a discrepancy that may be explained by the key role of FATP1 expressed in adipose tissue in whole body lipid metabolism. In summary, here we show that *in vivo* FATP1 reduced both serum fatty acids and intramuscular triglyceride content, suggesting it enhanced fatty acid oxidative disposal, as shown by others in skeletal [16] and cardiac [45] muscle. In contrast, this effect is limited [13] or not observed [11] in cultured myotubes, where FATP1 directs imported fatty acids mainly towards storage in triglycerides.

A striking finding of this work is the increment in serum β -hydroxybutyrate levels associated with muscle FATP1 overexpression. The skm, as well as cardiac muscle, has a high capacity to metabolize ketone bodies and it is widely accepted that the majority of used ketone bodies originate from the liver and are extracted from the circulation [41]. However, ketogenesis, which occurs mostly from β -oxidation-derived acetyl-CoA [41], has been demonstrated in isolated mouse skm mitochondria, i.e. production

of β -hydroxybutyrate from palmitate [46]. The key ketogenic gene encoding mitochondrial HMGCS2 is expressed at low levels in human skm at the transcript [47] and protein [48] level. However, the enzymes involved in ketone body oxidation, OXCT1 and mitochondrial thiolase, catalyze reversible reactions and, in consequence, tissues that oxidize ketone bodies have the potential to synthesize them [41]. In this regard, evidence has been obtained for the production of ketone bodies from palmitate in perfused rat heart, in a process mediated by the reversal of OXCT1 reaction [49]. Here, we found upregulation of *Hmgcs2* by the high-fat diet in skm, in agreement with the observation that *Hmgcs2* is upregulated by fatty acids in HeLa cells [50] and L6 myotubes [51]. FATP1 overexpression did not alter *Hmgcs2* mRNA levels in muscle from chow-fed mice, but prevented the rise caused by the high-fat diet, although no changes were observed at the HMGCS2 protein level. This suggested that increased ketonemia in FATP1-mice is not due to upregulation of the ketogenic gene *Hmgcs2* in skm. We thus reasoned that it could be due to regulation of OXCT1, a required enzyme for ketone body oxidation [52], which can be involved in ketogenesis [49]. We found that skm *Oxcl1* expression was

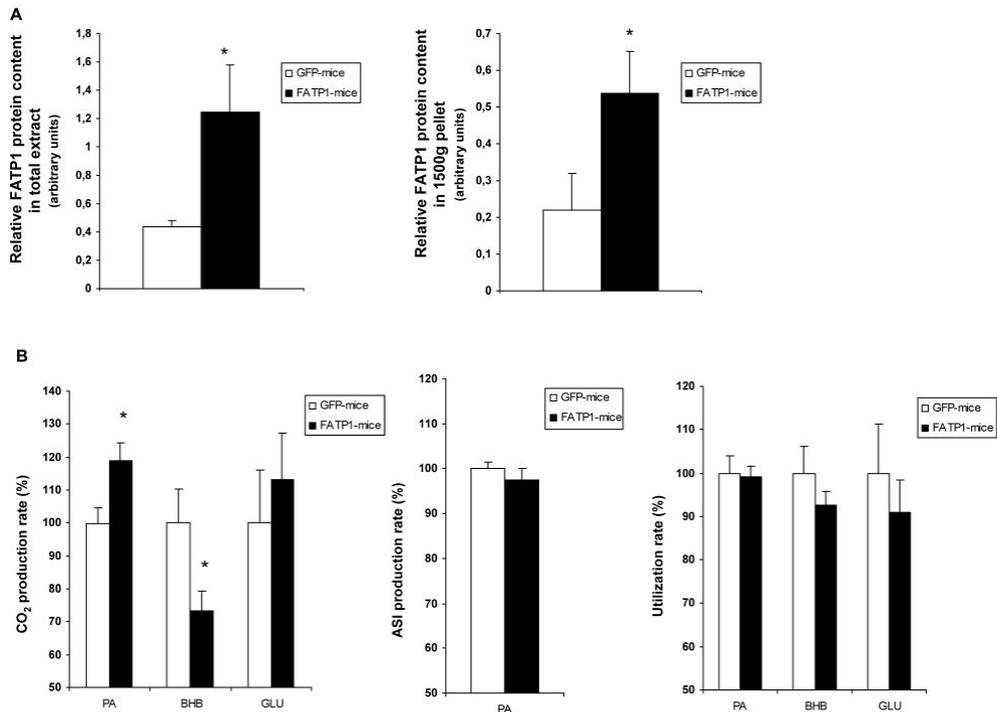


Figure 7. Effects of FATP1 overexpression on gastrocnemius muscle palmitate, β -hydroxybutyrate and glucose oxidation. Gastrocnemius muscle strips were prepared from pGFP- or pFATP1-electropored mice. (A) The FATP1 protein levels relative to α -tubulin levels were determined in total extracts and the 1500 g pellet fraction (20 μ g of protein) by immunoblotting. Bands were quantified with a LAS-3000 (FujiFilm). Data is the ratio of intensities of bands in arbitrary units and is the mean \pm SEM of at least five samples. (B) Muscle strips were incubated for 4 h with radioactively labelled palmitate (PA), β -hydroxybutyrate (BHB) or glucose (GLU). At the end of this period, substrate utilization rate, 14 C₂ production rate (and [14 C]acid-soluble intermediate metabolites (ASI) production rate in palmitate-incubated strips) were determined. Data are expressed as a percentage of control and are the means \pm SEM of seven muscle samples. (A,B) The significance of the Student's t test versus controls is * $p < 0.05$. doi:10.1371/journal.pone.0098109.g007

enhanced by FATP1 in mice fed chow, but unchanged in those fed a high-fat diet, while OXCT1 protein levels were unchanged in both diet conditions. Furthermore, we observed no repression of *Oxdl* by the high-fat diet in skm, in contrast to the repressing effect detected in mouse heart, as previously described [42]. We thus conclude that the diet-independent effect of FATP1 on ketone body disposal is not linked to *Oxdl* regulation in skm. Furthermore, we found no substantial intramuscular accumulation of β -hydroxybutyrate, associated to hyperketonemia, in high-fat-fed FATP1-mice compared to controls. Consequently hyperketonemia in FATP1-mice could be secondary to the FATP1-mediated enhanced oxidation of fatty acids in skm. The latter could impair the extraction and/or use of circulating ketone bodies, due to their competition for oxidation, i.e. inhibition of acetoacetate oxidation by fatty acids as shown in rat kidney cortex [53]; or augment ketogenesis, as a result of the high rate of fatty acid oxidation. We show that indeed FATP1 overexpression enhanced palmitate oxidation to CO₂, but not to acid-soluble intermediate metabolites (which include ketone bodies), while it inhibited CO₂ production from β -hydroxybutyrate, in isolated mouse gastrocnemius strips.

In addition, in isolated mitochondria from FATP1-overexpressing L6E9 myotubes, palmitoyl-CoA oxidation to CO₂ but not to acid-soluble metabolites is enhanced [13]. Therefore, we conclude that the ketone body sparing effect of skm FATP1 is due to inhibition of ketone body oxidation rather than to ketogenesis.

Circulating fed glucose and insulin levels were unchanged in FATP1- compared to GFP-mice fed either diet; and the same occurred with whole body glucose and insulin tolerance. Likewise, muscle-specific FATP1-overexpressing transgenic mice [16] have unaltered blood non-fasting glucose and insulin levels, before and after a high-fat diet, and unchanged glucose and insulin tolerance on a high-fat diet. All these data support that FATP1 overexpression in muscle does not predispose to high-fat diet-induced insulin resistance. In apparent contradiction, FATP1 gene ablation in mice prevents impaired insulin sensing in high-fat-fed animals [14,18]. Presumably, this discrepancy between muscle-restricted and genetic manipulation of endogenous FATP1 gene expression is due to a different contribution of adipose tissue FATP1 versus muscle FATP1 to whole body metabolism.

In cultured myotubes, FATP1 strongly stimulates glucose use and complete oxidation of glucose and lactate to CO₂, and activates PDH [12]. In this study, FATP1 had no effect on the levels of the active form of the PDH complex in skm of mice fed chow, nor did it enhance CO₂ production from glucose in isolated gastrocnemius strips. Thus, we conclude that FATP1 in skm does not exert an stimulatory effect on glucose use or PDH activity, in contrast to *in vitro* observations [12]. However, FATP1 lessened the strong reduction in PDH activation caused by the high-fat diet, a diet effect previously shown in rats [54]. Furthermore, FATP1 tended to attenuate the high-fat diet-induced increase in PDH-E1α site 2 phosphorylation, which is known to negatively regulate the rate-limiting PDH-E1 [43]. PDH is phosphorylated and inactivated by PDKs. The PDK4 gene is highly expressed in skm [55], is upregulated by high-fat diets [54,56,57] and has been proposed to underlie PDH inactivation in response to high-fat diets [54]. We found that FATP1 had no effect on skm *Pdk4* mRNA levels, in mice fed chow, in keeping with the lack of effect shown in cultured myotubes [12]; but it did significantly counteract to some degree *Pdk4* upregulation by the high-fat diet. Hence, FATP1 curbs high-fat diet induction of two genes regulated through a peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)-α mechanism, namely *Hmgs2* [50] and *Pdk4* [55]; whereas the mRNA level of *Oxct1*, which is not clearly regulated by PPAR-α [42], is differently affected by FATP1. It is possible that by stimulating fatty acid consumption FATP1 alters the PPAR-α-mediated pathway. In connection with this, in liver, 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine (which is generated by the novo lipid biosynthesis) has been identified as an endogenous ligand of PPAR-α [58].

In summary, our data provide further evidence for the localization of FATP1 in mitochondria in both skm tissue and

cultured cells, supporting the notion that FATP1 can exert an indirect effect on fatty acid use, likely based on its metabolic trapping activity, which could occur in different intracellular compartments including mitochondria. Moreover, our findings indicate that, in skm tissue, FATP1 enhances the use of fatty acids, which may be extracted from the circulation or mobilized from intramuscular triglyceride stores, and promotes fatty acid oxidation; effects that are known to be protective for insulin sensitivity in skeletal muscle [59], but pathogenic in cardiac muscle [45]. Concomitantly, FATP1 attenuates the effects of the high-fat diet on the skm mRNA levels of the PPAR-α target genes *Hmgs2* and *Pdk4*. Thus, suggesting that skm FATP1 protects against lipotoxicity and in consequence diet-induced metabolic dysregulation. However, FATP1 increases irrespective of diet circulating ketone bodies, an effect that is unrelated to the regulation of expression of the crucial ketone metabolic genes *Hmgs2* and *Oxct1* in skm, and likely due to the sparing of ketone body oxidation secondary to the enhanced fatty acid oxidation.

Acknowledgments

We thank Dr. Carles Lerin for helpful discussion of the manuscript and to Anna Orozco for technical support. We thank Xavier Remesar and Pedro Marrero for providing some of the materials used.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MG AMGF. Performed the experiments: MG TP JC JGV OOC D. Sala D. Sebastián. Analyzed the data: MG CGM AMGF. Contributed reagents/materials/analysis tools: AR AZ JCJC. Wrote the paper: MG AMGF.

References

- Kazantzis M, Stahl A (2012) Fatty acid transport proteins, implications in physiology and disease. *Biochim Biophys Acta* 1821: 852–857.
- Schwenk RW, Holloway GP, Luiken JJ, Bonen A, Glaz JF (2010) Fatty acid transport across the cell membrane: regulation by fatty acid transporters. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 82: 149–154.
- Schaffer JE, Lodish HF (1994) Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell* 79: 427–436.
- Lewis SE, Listenberger LL, Ory DS, Schaffer JE (2001) Membrane topology of the murine fatty acid transport protein 1. *J Biol Chem* 276: 37042–37050.
- Hall AM, Wiczor BM, Herrmann T, Stremmel W, Bernlohr DA (2005) Enzymatic properties of purified murine fatty acid transport protein 4 and analysis of acyl-CoA synthetase activities in tissues from FATP4 null mice. *J Biol Chem* 280: 11949–11954.
- Lobo S, Wiczor BM, Smith AJ, Hall AM, Bernlohr DA (2007) Fatty acid metabolism in adipocytes: functional analysis of fatty acid transport proteins 1 and 4. *J Lipid Res* 48: 609–620.
- Stahl A, Evans JG, Patel S, Hirsch D, Lodish HF (2002) Insulin causes fatty acid transport protein translocation and enhanced fatty acid uptake in adipocytes. *Dev Cell* 2: 477–488.
- Hatch GM, Smith AJ, Xu FY, Hall AM, Bernlohr DA (2002) FATP1 channels exogenous FA into 1,2,3-triacyl-sn-glycerol and down-regulates sphingomyelin and cholesterol metabolism in growing 293 cells. *J Lipid Res* 43: 1380–1389.
- Wiczor BM, Bernlohr DA (2009) A novel role for fatty acid transport protein 1 in the regulation of triacylglycerol synthesis and mitochondrial function in 3T3-L1 adipocytes. *J Lipid Res* 50: 2502–2513.
- Zhan T, Poppelreuther M, Ehehalt R, Füllekrug J (2012) Overexpressed FATP1, ACSVL4/FATP4 and ACSL1 increase the cellular fatty acid uptake of 3T3-L1 adipocytes but are localized on intracellular membranes. *PLoS One* 7: e45087.
- García-Martínez C, Marotta M, Moore-Carrasco R, Guaitar M, Camps M, et al. (2005) Impact on fatty acid metabolism and differential localization of FATP1 and FAT/CD36 proteins delivered in cultured human muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 288: C1264–1272.
- Guaitar M, Andreu AL, García-Arumí E, Briones P, Quintana E, et al. (2009) FATP1 localizes to mitochondria and enhances pyruvate dehydrogenase activity in skeletal myotubes. *Mitochondrion* 9: 266–272.
- Sebastián D, Guaitar M, García-Martínez C, Mauvezin C, Orellana-Gavaldá JM, et al. (2009) Novel role of FATP1 in mitochondrial fatty acid oxidation in skeletal muscle cells. *J Lipid Res* 50: 1789–1799.
- Wu Q, Ortegon AM, Tsang B, Doerge H, Feingold KR, et al. (2006) FATP1 is an insulin-sensitive fatty acid transporter involved in diet-induced obesity. *Mol Cell Biol* 26: 3455–3467.
- Stefányik LE, Bonen A, Dyck DJ (2012) Insulin and contraction-induced movement of fatty acid transport proteins to skeletal muscle transverse-tubules is distinctly different than to the sarcolemma. *Metabolism* 61: 1518–1522.
- Holloway GP, Chou CJ, Lally J, Stellingwerff T, Maher AC, et al. (2011) Increasing skeletal muscle fatty acid transport protein 1 (FATP1) targets fatty acids to oxidation and does not predispose mice to diet-induced insulin resistance. *Diabetologia* 54: 1457–1467.
- Mashek DG, Coleman RA (2006) Cellular fatty acid uptake: the contribution of metabolism. *Curr Opin Lipidol* 17: 274–278.
- Kim JK, Gimeno RE, Higashimori T, Kim HJ, Choi H, et al. (2004) Inactivation of fatty acid transport protein 1 prevents fat-induced insulin resistance in skeletal muscle. *J Clin Invest* 113: 756–763.
- Matsufuji T, Ikeda M, Naito A, Hirouchi M, Takakusa H, et al. (2012) Discovery and optimization of novel fatty acid transport protein 1 (FATP1) inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 22: 5067–5070.
- Yaffe D, Saxel O (1977) Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature* 270: 725–727.
- Jiménez-Chillaraón JC, Newgard CB, Gómez-Foix AM (1999) Increased glucose disposal induced by adenovirus-mediated transfer of glucokinase to skeletal muscle *in vivo*. *FASEB J* 13: 2153–2160.
- Crettaz M, Prentki M, Zaninetti D, Jeanrenaud B (1980) Insulin resistance in soleus muscle from obese Zucker rats. Involvement of several defective sites. *Biochem J* 186: 525–534.
- Hayasaki H, Shimada M, Kanbara K, Watanabe M (2001) Regional difference in muscle fiber type and glucose uptake of mouse gastrocnemius at rest. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 47 Online Pub: OL135–140.
- Lanni A, Moreno M, Lombardi A, Goglia F (1996) Biochemical and functional differences in rat liver mitochondrial subpopulations obtained at different gravitational forces. *Int J Biochem Cell Biol* 28: 337–343.
- Wiczorowski MR, Giorgi C, Lebedzinska M, Duszynski J, Pinton P (2009) Isolation of mitochondria-associated membranes and mitochondria from animal tissues and cells. *Nat Protoc* 4: 1582–1590.
- Schnaitman C, Ervin VG, Greenawald JW (1967) The submitochondrial localization of monoamine oxidase. An enzymatic marker for the outer membrane of rat liver mitochondria. *J Cell Biol* 32: 719–735.

27. Okamoto H, Hayaishi O (1970) Intramitochondrial localization of kynurenine aminotransferase. *J Biol Chem* 245: 3603–3605.
28. Pilegaard H, Birk JB, Sacchetti M, Mourtzakis M, Hardie DG, et al. (2006) PDH-E1 α dephosphorylation and activation in human skeletal muscle during exercise: effect of intralipid infusion. *Diabetes* 55: 3020–3027.
29. Ribes A, Riudor E, Briones P, Christensen E, Campistol J, et al. (1992) Significance of bound glutarate in the diagnosis of glutaric aciduria type I. *J Inher Metab Dis* 15: 367–370.
30. van Laack HL, Ruitenbeek W, Trijbels JM, Sengers RC, Gabreëls EJ, et al. (1988) Estimation of pyruvate dehydrogenase (E1) activity in human skeletal muscle; three cases with E1 deficiency. *Clin Chim Acta* 171: 109–118.
31. Colombini M (2012) VDAG structure, selectivity, and dynamics. *Biochim Biophys Acta* 1818: 1457–1465.
32. Tristan C, Shahani N, Sedlak TW, Sawa A (2011) The diverse functions of GAPDH: views from different subcellular compartments. *Cell Signal* 23: 317–323.
33. De Pinto V, Messina A, Lane DJ, Lawen A (2010) Voltage-dependent anion-selective channel (VDAC) in the plasma membrane. *FEBS Lett* 584: 1793–1799.
34. Wang I, Huang I (2000) Adenovirus technology for gene manipulation and functional studies. *Drug Discov Today* 5: 10–16.
35. Huard J, Lochmüller H, Acsadi G, Jani A, Massie B, et al. (1995) The route of administration is a major determinant of the transduction efficiency of rat tissues by adenoviral recombinants. *Gene Ther* 2: 107–115.
36. Quantin B, Ferricaudet LD, Tajbakhsh S, Mandel JL (1992) Adenovirus as an expression vector in muscle cells *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 2581–2584.
37. Walter G, Barton ER, Sweeney HL (2000) Noninvasive measurement of gene expression in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 5151–5155.
38. Jiménez-Chillarón JG, Tellemaque-Potts S, Gómez-Valadés AG, Anderson P, Newgard CB, et al. (2002) Glucokinase gene transfer to skeletal muscle of diabetic Zucker fatty rats improves insulin-sensitive glucose uptake. *Metabolism* 51: 121–126.
39. Johnson M, Huynh S, Burton J, Sato M, Wu L (2006) Differential biodistribution of adenoviral vector *in vivo* as monitored by bioluminescence imaging and quantitative polymerase chain reaction. *Hum Gene Ther* 17: 1262–1269.
40. Koch DD, Feldbrugge DH (1987) Optimized kinetic method for automated determination of beta-hydroxybutyrate. *Clin Chem* 33: 1761–1766.
41. Cotter DG, Schugar RC, Crawford PA (2013) Ketone body metabolism and cardiovascular disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 304: H160–76.
42. Wenz AE, d'Avignon DA, Weber ML, Cotter DG, Doherty JM, et al. (2010) Adaptation of myocardial substrate metabolism to a ketogenic nutrient environment. *J Biol Chem* 285: 24447–24456.
43. Sugden MC, Holness MJ (2003) Recent advances in mechanisms regulating glucose oxidation at the level of the pyruvate dehydrogenase complex by PDKs. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284: E855–862.
44. Marotta M, Ferrer-Martinez A, Parnau J, Turini M, Macé K, et al. (2004) Fiber type- and fatty acid composition-dependent effects of high-fat diets on rat muscle triacylglyceride and fatty acid transporter protein-1 content. *Metabolism* 53: 1032–1036.
45. Chiu HC, Kovacs A, Blanton RM, Han X, Courtois M, et al. (2005) Transgenic expression of fatty acid transport protein 1 in the heart causes lipotoxic cardiomyopathy. *Circ Res* 96: 225–233.
46. Seifert EL, Fiehn O, Bezaire V, Bickel DR, Wohlgemuth G, et al. (2010) Long-chain fatty acid combustion rate is associated with unique metabolite profiles in skeletal muscle mitochondria. *PLoS One* 5: e9834.
47. Mascaro G, Buesa C, Ortiz JA, Haro D, Hegardt FG (1995) Molecular cloning and tissue expression of human mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase. *Arch Biochem Biophys* 317: 385–390.
48. Puñac B, Ramos M, Arnedo M, Menao S, Gil-Rodríguez MC, et al. (2012) Characterization of splice variants of the genes encoding human mitochondrial HMG-CoA lyase and HMG-CoA synthase, the main enzymes of the ketogenesis pathway. *Mol Biol Rep* 39: 4777–4785.
49. Fink G, Desrochers S, Des Rosiers C, Garneau M, David F, et al. (1988) Pseudoketogenesis in the perfused rat heart. *J Biol Chem* 263: 18036–18042.
50. Rodríguez JC, Gil-Gómez G, Hegardt FG, Haro D (1994) Peroxisome proliferator-activated receptor mediates induction of the mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene by fatty acids. *J Biol Chem* 269: 18767–18772.
51. An J, Muoio DM, Shiota M, Fujimoto Y, Cline GW, et al. (2004) Hepatic expression of malonyl-CoA decarboxylase reverses muscle, liver and whole-animal insulin resistance. *Nat Med* 10: 268–274.
52. Cotter DG, Schugar RC, Wenz AE, d'Avignon DA, Crawford PA (2013) Successful adaptation to ketosis by mice with tissue-specific deficiency of ketone body oxidation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 304: E363–74.
53. Weidemann MJ, Krebs HA (1969) The fuel of respiration of rat kidney cortex. *Biochem J* 112: 149–166.
54. Holness MJ, Kraus A, Harris RA, Sugden MC (2000) Targeted upregulation of pyruvate dehydrogenase kinase (PDK)-4 in slow-twitch skeletal muscle underlies the stable modification of the regulatory characteristics of PDK induced by high-fat feeding. *Diabetes* 49: 775–781.
55. Jeong JY, Jeoung NH, Park KG, Lee IK (2012) Transcriptional regulation of pyruvate dehydrogenase kinase. *Diabetes Metab J* 36: 328–335.
56. Jeoung NH, Harris RA (2008) Pyruvate dehydrogenase kinase-4 deficiency lowers blood glucose and improves glucose tolerance in diet-induced obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295: E46–54.
57. Peters SJ, Harris RA, Wu P, Pebleman TL, Heigenhauser GJ, et al. (2001) Human skeletal muscle PDH kinase activity and isoform expression during a 3-day high-fat/low-carbohydrate diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281: E1151–1158.
58. Chakravarthy MV, Lodhi JJ, Yin L, Malapaka RR, Xu HE, et al. (2009) Identification of a physiologically relevant endogenous ligand for PPAR α in liver. *Cell* 138: 476–488.
59. Muoio DM (2010) Intramuscular triacylglycerol and insulin resistance: guilty as charged or wrongly accused? *Biochim Biophys Acta* 1801: 281–288.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Adipo-mioquinas: PTX3 y CCDC80

En este trabajo hemos analizado la expresión génica de las adipo-mioquinas PTX3 y CCDC80 en tejido adiposo en relación con la obesidad y el tipo de depósito de grasa visceral o subcutáneo.

Es conocido que existen amplias diferencias en el potencial adipogénico de células precursoras derivadas del SAT o el VAT, necesitando ambas, además, distintas señales para la diferenciación adipogénica [201]. Las células precursoras derivadas del VAT se diferencian eficientemente a adipocitos maduros tras su inducción con BMP4 y BMP2, mientras que las derivadas del SAT no dependen de estas señales. Las derivadas del VAT mantienen más propiedades afines a las células madre mesenquimales, expandiéndose mediante hipertrofia y contribuyendo a la inflamación en obesidad. En cambio, las derivadas del SAT se expanden principalmente mediante hiperplasia y permanecen metabólicamente intactas en obesidad. Finalmente, los adipocitos precursores del VAT parecen tener una capacidad reducida de lipogénesis [202] y una mayor capacidad de lipólisis [203] respecto a los que derivan del SAT.

Ambos tipos de depósito de grasa tienen también distintos perfiles inflamatorios. En individuos delgados, se observan niveles de mRNA de IL-6 en el VAT 10 veces mayores que en el SAT, y los de TNF α 1,6 veces mayores [204]. Además, los niveles secretados de IL-6 por explantes de VAT son marcadamente superiores a los secretados por explantes de SAT en cultivo [204], como ya se había demostrado para TNF α [205]. Al analizar marcadores de macrófagos, se ha visto que en VAT los niveles del marcador de macrófagos M1 CD68 eran 3,7 veces mayores en VAT respecto a SAT, lo que concuerda con el amplio número de macrófagos en este tejido, incluso en individuos delgados y niños. Al analizar marcadores de macrófagos M2, como son CD163 y la citoquina antiinflamatoria IL-10, se han hallado niveles 1,4 veces superiores de CD163 y secreciones 15 veces mayores de IL-10 en VAT que en SAT [204]. Esto indica que incluso en individuos

delgados el VAT contiene más macrófagos infiltrados como indican los mayores niveles de marcadores M1 y M2, lo que refleja una inflamación local de bajo grado.

Cuando se comparan ambos depósitos en individuos obesos, se encuentra en VAT una mayor expresión de genes relacionados con hipoxia, como son HIF-1 α , VEGFA, and GLUT1 [206]. Esta hipoxia no parece deberse a un fenómeno de rarefacción capilar, dado que la densidad vascular así como el número de EC resulta mayor en VAT que en SAT. No obstante, el fenotipo de las EC procedentes del VAT de obesos es marcadamente proangiogénico e inflamatorio, con una expresión disminuida de genes metabólicos, mientras que en el SAT no existen diferencias entre delgados y obesos, y podría estar asociado a una senescencia prematura de las ECs, como sugiere la expresión de ciertos marcadores [206]. Dicha senescencia podría estar inducida tanto por una extensiva replicación celular que lleva a una detención prematura del crecimiento celular, o a diversos estímulos de estrés, como el oxidativo [207]. Además, en individuos obesos se encuentra una mayor hipertrofia en el SAT respecto al VAT [26], a diferencia de lo observado en delgados, donde también se encuentra una mayor expresión de leptina, cuyos niveles, independientemente del depósito, correlacionan con el tamaño del adipocito [208].

En estos trabajos demostramos que la expresión de genes de PTX3 y CCDC80 está específicamente incrementada en VAT con la obesidad y está ligada a la inflamación. Se discute el posible papel de estos genes en el mantenimiento del equilibrio metabólico global.

Publicación 1/ Los niveles plasmáticos de PTX3 correlacionan inversamente con la secreción de insulina y la obesidad, mientras su expresión génica en el tejido adiposo visceral se ve incrementada en obesidad

Resultados: En la cohorte-1 los niveles plasmáticos de PTX3 resultaron negativamente correlacionados con los niveles basales de triglicéridos y la secreción de insulina tras la administración oral de glucosa. En la cohorte-2 se encontraron asociaciones inversas con el peso corporal y la relación cintura-

cadera. La expresión del gen de PTX3 era similar en VAT y SAT independientemente del grado de obesidad. En los depósitos de VAT, la expresión del gen de PTX3 a nivel de mRNA fue mayor en individuos con BMI > 25 kg/m² respecto a los delgados, y se correlacionó positivamente con los niveles de mRNA de IL-1 β . Cuando se separaron en ambos depósitos grasos los adipocitos de la fracción estromovascular, se observó que los niveles de expresión resultaron mayores en la fracción adipocitaria que en la estromovascular en VAT, y mayores en los adipocitos de VAT que de SAT. En los adipocitos SGBS la expresión génica de PTX3 se vio incrementada por IL- β y TNF- α pero no por IL-6 o insulina. En conclusión, la correlación negativa entre PTX3 y la secreción de insulina estimulada por glucosa sugiere un rol de PTX3 en el control metabólico. PTX3 es sobreexpresada en el VAT en obesidad, pese a observarse unos valores plasmáticos más bajos, así como por algunas citoquinas proinflamatorias en adipocitos cultivados.

Discusión: PTX3 es una proteína secretable de fase aguda, cuyos niveles plasmáticos se han asociado a la obesidad [188-190] el perfil de lípidos circulantes [189,190,192], aterosclerosis [209] e inflamación [210]. Aquí mostramos cómo también guardan una correlación negativa respecto a los niveles basales de TAGs, como ya se había encontrado en otros estudios [189,209].

También hallamos una correlación negativa con la secreción de insulina tras la administración oral e intravenosa de glucosa; lo que, por lo que sabemos, es la primera evidencia al respecto y concuerda con estudios previos donde los niveles plasmáticos de PTX3 resultaron ser menores en sujetos con MetS [189,209], una condición asociada a la resistencia a insulina.

Para explicar los niveles circulantes disminuidos de PTX3 en sujetos con hiperglicemia, hiperinsulinemia compensatoria incrementada, o MetS, podríamos sugerir dos hipótesis: PTX3 podría constituir un factor que proporciona protección frente al desarrollo de la enfermedad metabólica; o bien, sus niveles podrían bajar como consecuencia de dicho trastorno.

En una segunda cohorte con distintos valores de BMI mostramos que los niveles plasmáticos de PTX3 guardan una correlación negativa significativa con los índices de obesidad, específicamente el peso y el tamaño de la circunferencia de la cintura. Estos resultados concuerdan con estudios previos donde se asociaron negativamente sus niveles plasmáticos con la masa grasa [188], el BMI [189,190], el peso, y la circunferencia de la cintura [189]. Sin embargo, contrastan con otros estudios [191,192] en que asocian PTX3 positivamente con la obesidad y algunos factores de riesgo cardiovascular, donde se han relacionado mayores niveles circulantes de PTX3 en pacientes con MetS con la aterosclerosis subclínica [192], en obesos coexistiendo con una distensibilidad arterial reducida [191], y en infarto de miocardio agudo en correlación con la obesidad abdominal visceral [211]. No existe una explicación clara al respecto, y todos estos estudios proceden de estudios observacionales. Desafortunadamente no existen estudios mecanísticos que permitan interpretar mejor esta aparente anomalía en los niveles de PTX3 derivados de distintas patologías inflamatorias. Se podría hipotetizar que las diversas procedencias de PTX3 podrían cumplir distintas funciones en función del tejido o componente celular que la produzca.

Una de las aparentes incongruencias que encontramos es la relación entre la expresión génica de PTX3 en el WAT y los niveles plasmáticos en la cohorte de distintos BMIs. En ella analizamos los niveles de mRNA en muestras pareadas de los depósitos VAT y SAT. Encontramos mayores niveles de mRNA en el VAT de obesos que en el delgados, mientras que no había diferencias en el SAT. Un trabajo previo [212] mostró una tendencia a encontrarse mayores niveles de expresión en el VAT de obesos respecto a individuos con peso normal. Estos resultados concuerdan con datos previos en modelos murinos de obesidad genética (*ob/ob*) y diabética (*db/db*), donde se habían observado mayores niveles de mRNA de PTX3 en el WAT respecto a los ratones delgados [181]. Sin embargo, la expresión génica de PTX3 en WAT no explica los menores niveles plasmáticos encontrados en individuos con BMI $>25\text{kg/m}^2$ en nuestra cohorte. Esto podría indicar distintas funciones para PTX3 a nivel paracrino/autocrino y a nivel sistémico en obesidad. Este hallazgo no debería ser sorprendente, pues PTX3 se expresa en distintos tejidos y tipos celulares. Según la base de datos BioGPS

[192], en humanos el mRNA de PTX3 es más abundante en músculo liso, adipocitos, miocitos cardíacos y pulmón fetal. También está presente en los distintos compartimentos del riñón humano adulto [23]. Se necesita de posteriores estudios para determinar la contribución de cada uno de estos tejidos al pool plasmático de PTX3 y su posible regulación diferencial. Además, debería tenerse en consideración que la obesidad aparece asociada a una mayor proteólisis [214] y esto podría afectar a la producción de la proteína PTX3. Una de las posibles explicaciones, es que el principal contribuyente a los niveles circulantes de PTX3 no sea el WAT si no otro tejido como por ejemplo el endotelio vascular, órgano que por tamaño podría eclipsar los cambios en la secreción de PTX3 observados en el VAT durante la obesidad. Mientras que los niveles plasmáticos de CRP son más altos en individuos obesos o con MetS [218], las HDL inducen la expresión y secreción de PTX3 en células endoteliales a través de la activación de la vía PI3K/Akt [219], lo cual podría contribuir a la bajada de los niveles de PTX3 en individuos con MetS con menores niveles de HDL.

Nuestro estudio también muestra mayores niveles de mRNA de PTX3 en la fracción adipocitaria respecto a la estromovascular en el depósito de VAT, lo cual difiere de lo observado en ratones, donde se hallaron niveles mayores en la fracción estromovascular [181]. Esta diferencia podría explicarse por cumplir distintas funciones en roedores y humanos, como desde hace tiempo se sabe ocurre para otras pentraxinas como CRP y SAP [215] que comparten una homología en torno al 50% [184] y cumplen papeles equivalentes como proteínas de fase aguda.

El hecho de que la expresión génica de PTX3 responde a IL-1 β y TNF α pero no a IL-6, podría explicarse por la presencia en su promotor proximal de la región promotora NF- κ B que media en la respuesta a IL- β y TNF α , pero no a IL-6, en fibroblastos [216]. También mostramos que IL- β y TNF α producen paralelamente un aumento en el contenido proteico de PTX3 en el adipocito, donde incluso IL-6 produce un ligero aumento, no asociado con un aumento en la expresión génica, pero que podría estar relacionado con su demostrada capacidad para estimular la

síntesis proteica en neuronas sensoriales en cultivo [217]. También demostramos que este aumento en el contenido celular de proteína PTX3 mediado por IL- β y TNF α en adipocitos SGBS cultivados va acompañado de un aumento en su secreción. Por tanto, concluimos que ciertos factores proinflamatorios aumentados en obesidad, como son IL- β y TNF α podrían contribuir a la sobreexpresión de PTX3 en los depósitos de VAT en sujetos obesos, mientras que otros factores relacionados con la obesidad como el estrés oxidativo, la hipoxia o la hiperinsulinemia no regulan su expresión en adipocitos.

Por último, la concurrencia de menores niveles plasmáticos en obesidad, junto con una expresión génica aumentada en el VAT de obesos presumiblemente mediada por los mayores niveles de IL- β y TNF α , podría enmarcarse dentro del delicado equilibrio local en el WAT entre las respuestas inflamatoria y antiinflamatoria. El posible papel pro- o antiinflamatorio de PTX3 podría depender de la contribución relativa del tipo celular que la produce, del contexto y/o del estado de la enfermedad así como del propio contexto inflamatorio sistémico, ya que, como se ha observado en estudios *in vitro*, tanto estímulos proinflamatorios (LPS, TNF α , IL-1 β , y LDL oxidadas) [220-223] como antiinflamatorios (IL-10 y HDL) [179,219] pueden estimular la producción de PTX3. En suma, el distinto comportamiento de PTX3 respecto a CRP demuestra que las pentraxinas cortas y largas mantienen distintas relaciones con la patogénesis de la obesidad y el MetS, distintos roles biológicos y distintos orígenes celulares. Podrían subyacer distintos mecanismos complejos que regulan la producción de PTX3 en los distintos tipos celulares activados en el microambiente inflamatorio de pacientes con síndrome cardiometabólico.

Publicación 2/ La proteína CCDC80 en el tejido adiposo y en plasma en relación con la obesidad humana

Resultados: El contenido proteico total de CCDC80 resultó un 6% menor en el depósito de VAT respecto al de SAT en individuos delgados y marcadamente mayor en VAT, mientras que en SAT no varió, en individuos obesos respecto a los

delgados. Los niveles plasmáticos de CCDC80 se encontraron entre los 0.24 y los 9.1 ng/ml en ambas cohortes combinadas. En la cohorte con distintos grados de obesidad, los niveles correlacionaron negativamente con la secreción de insulina y los niveles de glucosa tras el test de tolerancia a la glucosa oral, y positivamente con el recuento de neutrófilos y los niveles circulantes de la proteína quimotáctica de monocitos 1, pero no se hallaron asociaciones con el BMI, sensibilidad a insulina o la edad. En la cohorte de obesos mórbidos, se asociaron con el grado de esteatosis hepática, los niveles circulantes de proteína C-reactiva y el espesor íntima-media carotídeo, pero no con el BMI o la edad. Así, la proteína CCDC80 forma parte de los componentes sobreexpresados en el tejido adiposo visceral en obesidad. Sus niveles circulantes están asociados con una mejora en la tolerancia a la glucosa pero también con marcadores inflamatorios, independientemente de la obesidad. En la obesidad mórbida, se asocian con un desajuste del perfil metabólico, incluyendo también inflamación, hígado graso y enfermedad vascular. En conclusión, CCDC80 puede ser uno de los factores del secretoma alterado en obesidad en el tejido adiposo y puede relacionarse con cambios metabólicos en otros órganos, podría contribuir a mejorar la captación de glucosa y su sobreexpresión se debe al perfil inflamatorio asociado a la obesidad más que a la obesidad en sí misma, pudiendo ser un componente patogénico o de comorbilidad en estas enfermedades.

Discusión: La dinámica de las proteínas de la matriz extracelular se ha convertido en un factor a tener en cuenta en la correcta homeostasis del adipocito y está regulado por varios procesos, incluyendo el metabolismo energético y la insulina. En este trabajo describimos por primera vez un patrón diferencial de expresión de la proteína secretada CCDC80 en función de su origen en WAT y su variación en obesidad en el VAT en humanos. Además, se muestra que los niveles circulantes de la proteína CCDC80 se asocian con un desajuste en la secreción de insulina, marcadores inflamatorios, la enfermedad de hígado graso y la aterosclerosis.

El gen humano de CCDC80 se expresa predominantemente en el WAT a nivel de mRNA [198,199], pero su patrón proteico y la posible divergencia en su contenido y regulación entre SAT y VAT en obesidad, eran desconocidos hasta la fecha. Es

conocido que SAT y VAT difieren en sus propiedades estructurales, funcionales y moleculares [224], y que la obesidad también puede regular diferencialmente la abundancia de determinadas proteínas en estos depósitos [225]. En este estudio, el análisis mediante *immunoblot* de la proteína CCDC80 en el WAT de individuos delgados demostró niveles más bajos en VAT que en SAT y un predominio de la forma molecular de secuencia completa de CCDC80. En los depósitos adiposos de los individuos obesos, hemos detectado una mayor proporción de formas moleculares pequeñas, que según se ha descrito proceden de la escisión mediante proteasas extracelulares [199], pero cuya actividad biológica todavía no ha sido definida. Nuestras observaciones coinciden con la noción de que en la obesidad existe una mayor remodelación de la matriz extracelular [226]. En individuos obesos, en comparación con delgados, el contenido total en CCDC80 aumentó considerablemente en los depósitos de VAT sin observarse cambios en el SAT. Por lo tanto, la proteína CCDC80 presenta diferencias entre los depósitos de WAT y una sobreexpresión asociada a la obesidad en humanos. Esto último difiere con lo observado a nivel de mRNA en modelos murinos de obesidad, donde sus niveles son menores en el WAT de ratones *ob/ob* y *KKAy* [198] y no varían en el de ratón deficiente para el receptor de bombesina *subtipo-3* [197].

También estudiamos el perfil intracelular de CCDC80 en la línea de adipocitos humanos SGBS a lo largo del proceso de diferenciación. Independientemente de estado de diferenciación de las células SGBS, se observó una amplia gama de formas moleculares (entre los 150 y los 75 kDa), siendo especialmente prominente la forma molecular de aproximadamente 150 kDa. Un péptido proteico similar había sido descrito previamente en cultivo primario de adipocitos humanos así como en células 293 expresando de forma ectópica CCDC80 humana, esto es, un gran número de formas moleculares entre los 150 y los 50 kDa [198]. La forma molecular de 150 kDa se cree que procede de la N-glicosilación de la proteína [227,228], aunque se desconoce el papel que esta modificación postraduccional. Por lo tanto, existen observaciones consistentes de abundantes formas de alto peso molecular de la proteína CCDC80 en adipocitos cultivados atribuibles a formas glicosiladas de la proteína, mientras que se encontró una menor presencia de estas formas en los depósitos de WAT.

Por otro lado, se encontró el mayor contenido intracelular de CCDC80 en los adipocitos maduros, en comparación con etapas anteriores de diferenciación, lo que concordó con los niveles de mRNA más altos. La expresión del gen CCDC80 durante el proceso adipogénico ha sido descrita a nivel de ARNm en la línea celular de adipocitos 3T3L1, donde los niveles en dos adipocitos maduros resultaron más altos [198] o similares a [199] los preadipocitos confluentes. Durante las etapas tempranas de la diferenciación, se encontró en estas células una expresión transitoria [198,199], asociada al efecto inhibitorio de los factores adipogénicos añadidos, IBMX y dexametasona [199]. De forma similar, encontramos una reducción del contenido proteico durante las primeras etapas de diferenciación en preadipocitos confluentes SGBS, que también podría ser atribuible a la adición de los factores adipogénicos dexametasona, IBMX y rosiglitazona.

Respecto a la secreción, se ha detectado la presencia de CCDC80 en los medios de cultivo de la línea SGBS a todos los estados de diferenciación como son preadipocitos postconfluentes, en diferenciación y adipocitos maduros. Se encontró una reducción de la acumulación en los medios en las primeras etapas de diferenciación, coincidiendo con una menor acumulación intracelular. Sin embargo, los niveles en el medio siguieron bajando en los adipocitos maduros, pese a una acumulación intracelular máxima. Estudios previos habían mostrado que CCDC80 es secretada por adipocitos humanos en cultivo [198], adipocitos 3T3L1 diferenciados [199] y células COS7 expresando Ccdc80 de ratón [228]. Además, dichas células COS7 secretaron el Ccdc80 transfectado en su forma glicosilada y no glicosilada [228].

Posteriormente analizamos los niveles plasmáticos de CCDC80 en humanos y su asociación con la obesidad y las enfermedades asociadas a ésta. Trabajamos con la premisa de que dado que la expresión de CCDC80 es predominante en el tejido adiposo, y se encontraba sobreexpresada en VAT en obesidad, los procesos asociados a la obesidad podrían relacionarse con los niveles de CCDC80 circulantes. Un estudio no detectó Ccdc80 en suero de ratón, mostrando que la

técnica usada no fue suficientemente sensible para su detección o bien que esta proteína actúa como un factor local en el WAT [200]. En este estudio, empleando ELISA, detectamos unos niveles plasmáticos de proteína de CCDC80 en un rango entre los 0,24 y los 9,1 ng/ml en las dos cohortes combinadas, cubriendo un amplio intervalo de BMI (entre 20 y 60 Kg/m²).

En la cohorte con distintos grados de obesidad (desde delgados a obesos mórbidos), no observamos ninguna asociación entre la proteína CCDC80, el BMI y la edad, pero sí una correlación negativa con la respuesta guda de insulina a glucosa (AIRg). Resulta reseñable el hecho de que el modelo de ratón que carece del gen de *Ccdc80* [200], alimentado con una dieta HFD, incrementa su intolerancia a la glucosa y desajusta su secreción de insulina en respuesta a glucosa *in vivo*, lo cual sugiere que CCDC80, bien en circulación o de forma local (la expresión de *Ccdc80* es relativamente baja en el páncreas pero insignificante en los islotes pancreáticos) modula la secreción de insulina.

Otro hallazgo en esta cohorte fue que los niveles circulantes de CCDC80 correlacionan positivamente con marcadores de inflamación, como son el recuento de neutrófilos en sangre y los niveles circulantes de MCP-1. La obesidad es una condición de inflamación de bajo grado asociada a ciertos mediadores inflamatorios como el recuento de neutrófilos [229] y la proteína quimioatrayente MCP-1 [230]. De hecho, los niveles de MCP-1 circulante es uno de los factores que asocia la obesidad con las complicaciones metabólicas relacionadas con ella como son la aterosclerosis [231], la resistencia a insulina [231-233] y la esteatosis hepática [233]. El hecho de que la CCDC80 circulante no se relacione con el BMI pero sí con marcadores inflamatorios sugiere que refleja la condición inflamatoria independientemente de la obesidad.

Los datos referentes a la cohorte de individuos obesos mórbidos arrojan alguna evidencia más acerca de su asociación con marcadores de inflamación, y revela una relación con la enfermedad inflamatoria y metabólica vascular y hepática. Encontramos que los niveles plasmáticos se asocian sólo con el marcador inflamatorio CRP, si no también con el grado de esteatosis hepática. Además,

también se asociaron con el grosor íntima-media carotídeo, como marcador de aterosclerosis. Una vez más, no se hallaron asociaciones con el BMI o la edad. De hecho, la enfermedad del hígado graso y el riesgo de CVD se sabe que están estrechamente asociados con marcadores de inflamación circulantes. Por ejemplo, se ha asociado a CRP con la esteatosis hepática de forma independiente a la adiposidad visceral en varios estudios [234,235], así como al grosor íntima-media carotídeo [236]. Además, la NAFLD puede predecir un perfil de mayor riesgo aterogénico [235]. La expresión génica de CCDC80 en el hígado humano se ha encontrado insignificante [198,199] y no existen datos de su expresión en lesiones aterogénicas. Por tanto, podríamos especular con que la CCDC80 circulante puede cumplir un papel en estos procesos patogénicos o ser un parámetro de comorbilidad asociado a la obesidad severa. No existen evidencias de la acción de esta proteína en el hígado, pero la delección de Ccdc80 en ratones ha mostrado que modula genes de ciclo circadiano en el WAT, músculo esquelético y páncreas a nivel transcriptómico, pero sus efectos en el hígado todavía deben ser estudiados [200].

En conclusión, mostramos una sobreexpresión de los niveles proteicos de CCDC80 en el VAT de pacientes obesos respecto a los delgados, sugiriendo que podría ser uno de los componentes del secretoma alterados en obesidad en este depósito y podría asociarse a cambios metabólicos en otros órganos. En este sentido, mostramos una asociación entre los niveles circulantes de CCDC80 y el desajuste de la secreción de insulina, además de marcadores de inflamación circulantes, en una cohorte con un amplio rango de BMI, de forma independiente a la obesidad. Estos datos indican que la sobreexpresión de la proteína CCDC80 se relaciona con el estado inflamatorio asociado a obesidad más que a la obesidad en sí misma y podría modular la captación de glucosa y la secreción de insulina *in vivo*. En la obesidad mórbida, los niveles plasmáticos de CCDC80 se asociaron con complicaciones crónicas asociadas a inflamación, como son la enfermedad del hígado graso y la aterosclerosis, sugiriendo que CCDC80 podría ser un factor patogénico o de comorbilidad para estas enfermedades.

Publicación 3/ La proteína transportadora de ácidos grasos FATP1 se localiza en la mitocondria en células de músculo esquelético de ratón y regula la disponibilidad de lípidos y cuerpos cetónicos

Resultados: La proteína FATP1 endógena se detectó en las fracciones de membrana plasmática y mitocondrial, obtenidas mediante centrifugación diferencial de músculo gastrocnemius, siendo predominante en las mitocondrias purificadas, en concreto en la membrana externa y la porción soluble intermembrana, no en la membrana mitocondrial interna y la matriz. Cuando FATP1 se sobreexpresó en el gastrocnemius de ratón mediante electroporación, se incrementó la oxidación de palmitato a CO₂, pero no a metabolitos intermediarios solubles en ácido, mientras que la producción de CO₂ a partir de β-hidroxiacetato se vio inhibida y a partir de glucosa no cambió, en tiras aisladas de gastrocnemius de ratón. En resumen, FATP1 se localizó en la mitocondria, membrana externa e intermembrana mitocondrial de músculo esquelético de ratón, lo que podría resultar crucial en sus efectos metabólicos. La sobreexpresión de FATP1 incrementó la disponibilidad de FAs sistémicos y triglicéridos intramusculares y no contribuyó a la desregulación metabólica inducida por HFD. Sin embargo, FATP1 propició una hipercetonemia, probablemente secundaria a la reducción de la oxidación de cuerpos cetónicos en beneficio de la oxidación de FAs, debido a un desajuste en la extracción y/o uso de los cuerpos cetónicos circulantes usados en competencia con los FAs como sustrato oxidable. *[Se describe sólo la parte experimental que he desempeñado]*

Discusión: Tradicionalmente se pensaba que el transporte de FAs de cadena larga a través de la membrana plasmática se llevaba a cabo mediante difusión pasiva. Sin embargo, en los últimos años se ha aseptado la idea de que ocurre mediante mecanismos mediados por proteínas. Las proteínas asociadas a membrana que unen FAs, los “transportadores de FAs” no sólo facilitan la captación celular si no también podrían regular el destino metabólico de los mismos.

FATP1 se considera un mediador en la captación de Ca^{2+} por parte del músculo esquelético, pero su localización intracelular predominante todavía es sujeto de debate. Nuestros resultados refuerzan la evidencia de su localización mitocondrial, tanto en músculo esquelético como en células musculares cultivadas. En este trabajo mostramos que la proteína FATP1 endógena, en músculo esquelético de ratón, se encuentra principalmente en la fracción isular mitocondrial así como es abundante en las mitocondrias purificadas, y que la FATP1 transfectada incrementó el contenido proteico de FATP1 en la fracción mitocondrial. Un estudio previo realizado en músculo soleus aislado de ratón reveló una marcada localización intracelular de la FATP1 endógena en una población de vesículas no definida [103]. Sin embargo, esta hipótesis de sublocalización mitocondrial no fue apoyada al transfectar en músculo de rata FATP1, en el cual no se observó un incremento de la proteína en la mitocondria [105]. Además, tras aplicar digitonina seguida de centrifugación diferencial a las mitocondrias purificadas, aportamos una idea de la localización submitocondrial de FATP1. Ésta se detectó en la membrana mitocondrial externa y en la fracción intermembrana, y no en la fracción de membrana mitocondrial interna y matriz mitocondrial. Considerando que FATP1 es una proteína integral de membrana con un dominio transmembrana [237], sugerimos que podría ser una proteína integral de membrana externa. Finalmente, mediante localización inmunocitoquímica por microscopía electrónica *immunogold*, proporcionamos evidencias de la localización mitocondrial de la proteína FATP1-GFP en células musculares C2C12. De acuerdo con resultados de estudios previos de nuestro grupo, la proteína FATP1 endógena en células de músculo esquelético humanas y murinas en cultivo se encontró presente en las fracciones enriquecidas en mitocondria [102], y la proteína de fusión FATP1-GFP se colocalizó con marcadores mitocondriales en células musculares C2C12 [102] y L6E9 [82]. De hecho, el análisis bioinformático de FATP1 predice su importación a la mitocondria, así como de otros dos miembros de la familia FATP, FATP2 y FATP4; y mediante ensayos de unión cruzada proteica se han identificado una serie de proteínas mitocondriales y asociadas a mitocondria que unen FATP1 en adipocitos 3T3-L1 [99]. No obstante, cabe recalcar que, dado que en otro estudio no se ha observado una coincidencia significativa de FATP1 con la mitocondria [100], la localización mitocondrial de FATP1 en adipocitos sigue abierta a debate.

Por otro lado, en este estudio mostramos que FATP1 también se halla presente en la fracción enriquecida en membrana plasmática de músculo gastrocnemius de ratón, lo que concuerda con la descripción de su localización en el sarcolema de los músculos de las extremidades inferiores de ratón [103,104,107], y la membrana plasmática de adipocitos 3T3-L1 [96,97,238]. Este tipo de localización dual también ha sido descrito para la proteína VDAC, abundante en la membrana mitocondrial externa pero también presente en la membrana plasmática [239].

Se ha descrito un efecto diferencial de la sobreexpresión de FATP1 en el metabolismo de los FAs, por el que, en células de músculo esquelético cultivadas, de forma consistente, promueve la destinación de los FAs hacia el almacenamiento como TAGs [82,101], mientras que en músculo esquelético cultivado de ratón, los dirigió hacia su oxidación en vez de su acumulación [105]. Para profundizar en el verdadero papel bioquímico que estaría cumpliendo en músculo esquelético FATP1 *in vivo*, empleamos un adenovirus para expresar el gen de FATP1 en el músculo de las extremidades inferiores de ratones que después fueron alimentados con dieta normal o HFD tras el destete. La sobreexpresión de FATP1 no influyó en el peso corporal de los ratones con ninguna de las dietas, de la misma forma que tampoco se observaron efectos en el peso corporal en modelos de ratones transgénicos que sobreexpresaban FATP1 de forma específica en músculo, respecto a los salajes, indistintamente de ser alimentados con dieta normal o HFD [105]. Los niveles postprandiales de TAGs en suero no cambiaron en los ratones FATP1 respecto a los GFP indistintamente de la dieta. Sin embargo, los niveles de FAs se redujeron y los de β -hidroxibutirato, aumentaron. El incremento en la disponibilidad sistémica de FAs en los ratones FATP1 está acorde con la demostrada capacidad de la FATP1 sobreexpresada de participar en la captación de FAs, como se ha mostrado en las células de músculo esquelético cultivadas [101] y en tejido muscular [105]. Así, encontramos una reducción en los niveles de IMTGs mediada por la sobreexpresión de FATP1 de forma independiente a la dieta, y no encontramos cambios asociados a ésta, como ya se había observado en músculo de rata [240]. Nuestros datos divergen de los obtenidos en ratones transgénicos que sobreexpresaban FATP1 de forma músculo-específica [105], donde no cambiaron los niveles de TAGs y NEFAs en suero sin

ayuno respecto a los ratones salvajes, antes o después de ser alimentados con HFD, como tampoco varió el contenido en IMTGs tras HFD. Proponemos que este distinto patrón en el metabolismo lipídico puede deberse a distintas adaptaciones metabólicas en ambos modelos, el transgénico músculo-específico (expresado en corazón y músculo esquelético) y la transferencia prenatal de FATP1 dirigida al músculo esquelético mediante adenovirus. Por otro lado, en nuestros ratones FATP1, el contenido en TAGs tanto en hígado como WAT no cambió respecto a los ratones GFP, indicando que no existe una redistribución de las reservas tisulares de TAGs. Estos datos contrastan con aquellos obtenidos de la supresión de FATP1 en ratones, que sí causa una redistribución de los lípidos desde el WAT y músculo hacia el hígado, tanto alimentados con dieta alta como baja en grasas [103], una discrepancia que podría explicarse por un papel clave de la FATP1 expresada en el WAT sobre el metabolismo lipídico sistémico. En resumen, en este trabajo mostramos que FATP1 *in vivo* reduce tanto los niveles séricos de TAGs como el contenido en IMTGs, sugiriendo que aumenta la disponibilidad de los FAs para su oxidación, como ha sido ya demostrado en músculo esquelético [105] y cardíaco [241]. Sin embargo, este efecto ha sido limitado [82] o no se ha observado [101] en miotubos cultivados, donde FATP1 dirigió los FAs transportados principalmente hacia su almacenamiento en TAGs.

Un hallazgo novedoso en este trabajo ha sido el incremento de los niveles séricos de β -hidroxibutirato asociado a la sobreexpresión muscular de FATP1. El músculo esquelético, así como el cardíaco, posee una elevada capacidad para metabolizar cuerpos cetónicos, y está ampliamente aceptado que la mayor parte de éstos se proceden del hígado y son extraídos de la circulación [242]. Sin embargo, la cetogénesis, que ocurre principalmente a partir de acetil-CoA derivados de la β -oxidación [242], se ha demostrado en mitocondrias aisladas de músculo esquelético de ratón, como es el caso de la producción de β -hidroxibutirato a partir de palmitato [243]. El gen clave cetogénico que codifica la HMGCS2 mitocondrial, se expresa en baja medida a nivel de transcrito [24] y proteína [245] en músculo esquelético humano. Sin embargo, las enzimas involucradas en la oxidación de cuerpos cetónicos, como son OXCT1 y la tiolasa mitocondrial, catalizan reacciones reversibles y, en consecuencia, los tejidos que oxidan cuerpos cetónicos poseen el

potencial de sintetizarlos [242]. En este sentido, se han obtenido evidencias de la producción de cuerpos cetónicos a partir de palmitato en corazón de rata profundido, en un proceso mediado por la reacción reversible de OXCT1 [246]. En este trabajo, encontramos una sobreexpresión del gen *Hmgcs2* mediada por la HFD en músculo esquelético, lo que concuerda con la observación de que este gen está sobreexpresado por FAs en las células HeLa [247] y miotubos L6 [248]. La sobreexpresión de FATP1 no varió los niveles de mRNA de *Hmgcs2* en músculo de ratones alimentados con la dieta normal, pero previno el aumento causado por la HFD, a pesar de no observarse cambio a nivel proteico de HMGCS2. Esto sugiere que la cetogénesis incrementada en los ratones FATP1 no es debida a la sobreexpresión del gen *Hmgcs2* en músculo esquelético. Inferimos, por tanto, que podría deberse a la regulación de OXCT1, un enzima requerido para la oxidación de cuerpos cetónicos [242], que podría estar implicado en la cetogénesis [246]. Hemos encontrado que la expresión del gen *Oxct1* en músculo esquelético aumentó por FATP1 en ratones alimentados con dieta normal, pero no varió en los alimentados con HFD, mientras que a nivel proteico, los niveles de OXCT1 no cambiaron con ninguna de las dos dietas. Además, no observamos una represión de *Oxct1* por parte de la HFD en músculo esquelético, a diferencia de lo observado en corazón de ratón [249], como se ha descrito anteriormente. Concluimos por tanto que el efecto independiente de la dieta de FATP1 sobre la disponibilidad de cuerpos cetónicos no está asociada a una regulación de *Oxct1* en músculo esquelético. Además no encontramos una acumulación intramuscular sustancial de β -hidroxibutirato, asociada a la hipercetonemia, en los ratones FATP1 alimentados con dieta HFD respecto a los controles. Consecuentemente, la hipercetonemia en ratones FATP1 podría ser secundaria al incremento en la oxidación de FAs mediada por FATP1 en músculo esquelético. Esto último podría desajustar la captación y/o el uso de los cuerpos cetónicos circulantes, debido a su competición por la oxidación, por ejemplo la inhibición de la oxidación de acetoacetato mediada por los FAs observada en la corteza renal de rata [250]; o al aumento de la cetogénesis como resultado de la alta ratio de oxidación de FAs. Aquí mostramos que de hecho la sobreexpresión de FATP1 incrementó la oxidación de palmitato a CQ, pero no a metabolitos intermedios solubles en ácidos (lo que incluye cuerpos cetónicos), mientras que

inhibió la producción de CO_2 a partir de β -hidroxibutirato, en tiras de gastrocnemius aislado de ratón. En esta misma línea nuestro grupo demostró en mitocondrias aislada de miotubos L6 que sobreexpresaban FATP1, un incremento en la oxidación de palmitoil-CoA a CO_2 , pero no a metabolitos intermedios solubles en ácidos [82]. Por tanto, concluimos que el efecto de FATP1 en músculo esquelético sobre la preservación de los cuerpos cetónicos es debido a la inhibición de su oxidación, más que a un proceso de cetogénesis.

Los niveles postprandiales de glucosa e insulina no variaron entre ratones FATP1 y GFP indistintamente de la dieta, y lo mismo ocurrió con los niveles sistémicos de glucosa y la tolerancia a insulina. De igual forma los ratones transgénicos que sobreexpresaban FATP1 de forma específica en músculo [105] no variaron sus niveles de glucemia sin ayuno y de insulina, antes y después de la HFD. Todos estos datos apoyan que la sobreexpresión de FATP1 en músculo no predispone a una resistencia a insulina inducida por la HFD. En una aparente contradicción, la delección génica de FATP1 en ratones previene el desajuste de la sensibilidad a insulina en animales alimentados con HFD [103,107]. Presumiblemente esta discrepancia entre la manipulación genética de la expresión endógena de FATP1 y aquella restringida al músculo, se deba a una distinta contribución de la FATP1 del tejido adiposo y la muscular al metabolismo sistémico.

En miotubos cultivados, FATP1 estimuló fuertemente el uso de glucosa y la oxidación completa de la glucosa y el lactato a CO_2 , a la vez que activó la PDH [102]. En este estudio FATP1 no tuvo efecto sobre los niveles de la forma activa del complejo PDH en músculo esquelético de ratones con dieta normal, así como tampoco incrementó la producción de CO_2 a partir de glucosa en tiras de gastrocnemius aisladas, por lo que concluimos que FATP1 en músculo esquelético no ejerce un efecto estimulante en el uso de la glucosa o la actividad PDH, en contraste con las observaciones realizadas *in vitro* [102]. Sin embargo, FATP1 aligeró la fuerte bajada en la activación de PDH producida por la HFD, un efecto dependiente de la dieta observado anteriormente erratas [251]. Además, FATP1 mostró una tendencia a atenuar el incremento inducido por la HFD sobre la fosforilación en el lugar 2 de la subunidad PDH-E1 α , conocido por regular

negativamente la actividad de PDH-E1 [252]. PDH esfosforilada e inactivada mediante PDKs. El gen PDK4 se encuentra altamente expresado en músculo esquelético [253], se sobreexpresa en respuesta a HFD [251,254,255] y se ha propuesto que subyace a la inactivación de PDH en respuesta a HFD [251]. Encontramos que FATP1 no tiene efecto sobre los niveles de mRNA de *Pdk4* en músculo esquelético en ratones con dieta normal, en consonancia con la ausencia de efectos observada en miotubos cultivados [102], mientras que redujo en cierto grado a la sobreexpresión de *Pdk4* mediada por la HFD. Por tanto, FATP1 reprimió la expresión inducida por la HFD de dos genes regulados a través de un mecanismo mediado por PPAR-alfa, como son *Hmgcs2* [247] y *Pdk4* [253]; mientras que los niveles de mRNA de *Oxct1*, el cual no está claramente regulado por PPAR-alfa [249], está regulado de distinta forma por FATP1. Es posible que FATP1 mediante la estimulación del consumo de FAs a través de la vía mediada por PPAR-alfa. A este respecto, en hígado se ha identificado como ligando endógeno de PPAR-alfa a la 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfolina, generada mediante la biosíntesis de lípidos de novo [256].

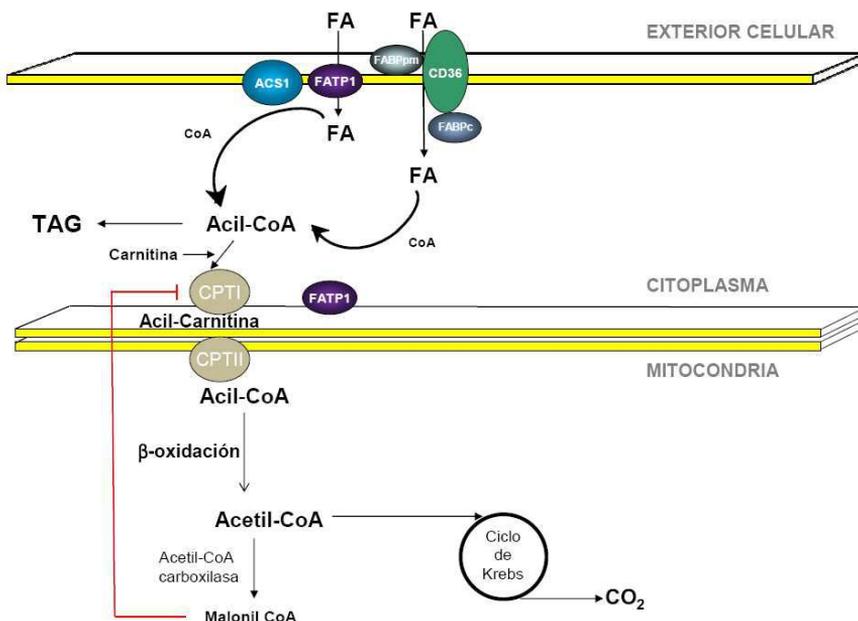


Figura 8. FATP1, un mediador indirecto de la captación y oxidación de FAs en la célula muscular. En la figura se muestra la localización predominante de FATP1 en la membrana mitocondrial respecto a la membrana plasmática, su actividad acil-CoA sintetasa y su posible acción coordinada con el sistema CPT para dirigir el flujo de FAs a la mitocondria.

En resumen, nuestros datos arrojan nuevas evidencia acerca de la localización de FATP1 en mitocondria tanto en músculo esquelético como en células musculares cultivadas. Apoyan la idea de que FATP1 ejerce un efecto indirecto sobre el uso de los FAs, probablemente basado en su actividad metabólica acil-CoA sintetasa en la membrana mitocondrial externa lo cual aumentaría el flujo de acil-CoAs transportados a la mitocondria mediante el sistema CPT translocasa, y de este modo, su oxidación (Fig. 8). De hecho, nuestros hallazgos indican que en músculo esquelético, FATP1 incrementa el uso de FAs los cuales pueden ser captados de la circulación o movilizados desde las reservas de IMTGs. Estos efectos se sabe con protectores de la sensibilidad a insulina en músculo esquelético [257], pero patogénicos en el cardíaco [241]. Consecuentemente, FATP1 atenúa los efectos de la HFD a nivel del mRNA de los genes diana de PPAR-alfa *Hmgcs2* y *Pdk4*, sugiriendo por tanto que la FATP1 de músculo esquelético protege frente a la lipotoxicidad y portanto frente a la desregulación metabólica inducida por la dieta. Sin embargo, FATP1 incrementa los cuerpos cetónicos circulantes independientemente de la dieta, un efecto no relacionado con la regulación de la expresión de genes cruciales en el metabolismo de los cuerpos cetónicos *Hmgcs2* y *Oxct1* en músculo esquelético, probablemente debido a un ahorro en la oxidación de cuerpos cetónicos, secundario al aumento de la oxidación de FAs.

CONCLUSIONES

1. La expresión génica de PTX3 se ve aumentada en el depósito VAT en obesidad, pese a encontrarse unos menores niveles plasmáticos, y en respuesta a citoquinas proinflamatorias en adipocitos cultivados. La correlación negativa entre PTX3 y la secreción de insulina estimulada por glucosa sugiere que PTX3 cumple un papel en el control metabólico.
2. CCDC80 está incrementada en el depósito VAT en obesidad. En una población con distintos grados de obesidad, sus niveles circulantes están asociados con una mejora en la tolerancia a la glucosa y una menor secreción de insulina, pero también con marcadores inflamatorios, independientemente de la obesidad. En la obesidad mórbida, se asocian con inflamación, hígado graso y enfermedad vascular. Por tanto, CCDC80 puede ser un regulador metabólico y un componente patogénico, o de comorbilidad de enfermedades asociadas, en la obesidad.
3. FATP1 se localiza en la mitocondria, en las fracciones de membrana externa e intermembrana en músculo esquelético de ratón. Su sobreexpresión incrementa la disponibilidad tanto de FAs sistémicos como triglicéridos intramusculares, pero no contribuye a la desregulación metabólica inducida por la dieta grasa. Sin embargo produce hipercetonemia, probablemente secundaria al ahorro en la oxidación de cuerpos cetónicos, resultante del incremento de la oxidación de los FAs.

ABREVIATURAS

ACC – Acetil-CoA carboxilasa
 ACC2 - Acetil-CoA carboxilasa 2
 Akt - Proteín quinasa B
 AMPK - Proteín quinasa activada por AMP
 APS - Proteína adaptadora con 2 dominios homólogos a Pleckstrina y Src
 AS160 - Sustrato de Akt de 160 kDa
 ASC1 – Acil-CoA sintasa 1
 ASP – Proteína estimulante de la acilación
 ATF6 - Factor de transcripción activador 6
 ATGL - Adipo-triglicérido-lipasa
 ATMs - Macrófagos de tejido adiposo
 ATP - Adenosín trifosfato
 BMI – Índice de masa corporal
 bZIP – Cremallera básica de leucina
 CACT - Carnitina-acilcarnitina translocasa
 CD14 - Grupo de diferenciación 14
 CoA - Coenzima A
 CPT-1 - Carnitina palmitoiltransferasa 1
 CRP – Proteína C-reactiva
 CTPs - Carnitina palmitoiltransferasas
 CVD – Enfermedad cardiovascular
 DAG - Diacilglicerol
 DIO - Obesidad inducida por la dieta
 DM – Diabetes mellitus
 EC – Células endoteliales
 ER - Retículo endoplasmático
 ERK - Quinasa regulada por señal extracelular
 FABP - Proteína de unión a ácidos grasos
 FAs – Ácidos grasos
 FATP1 - Transportador de ácidos grasos tipo 1
 Gab-1 - Proteína 1 de unión a GRB2 asociado
 G-CSF - Factor estimulante de colonias de granulocitos
 GFP - Proteína verde fluorescente
 GLUT4 – Receptor de la glucosa tipo 4
 GM-CSF - Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
 HDL - Lipoproteína de alta densidad
 HFD - Dieta alta en grasas
 HIF1A - Subunidad alfa del factor 1 inducible por hipoxia
 HSL - Lipasa sensible a hormonas
 IBMX - 3-isobutil-1-metilxantina
 IFN - Interferón
 IκB - Inhibidor de NFκB
 IL-6 – Interleuquina 6
 IMTG – Triglicéridos intramiocelulares
 iNOS - Óxido nítrico sintasa inducible
 IR – Receptor de la insulina
 IRS – Sustrato del receptor de la insulina
 IRS-1 – Sustrato 1 del receptor de insulina
 JNK - Quinasa c-Jun N-terminal
 LDL - Lipoproteína de baja densidad
 LPL - Lipoproteínlipasa
 LPS – Lipopolisacárido
 LXR – Receptor X hepático
 MAPKs - Proteín quinastas activadas por mitógenos
 MCP-1 - Proteína quimioatrayente de monocitos tipo 1
 M-CSF - Factor estimulante de colonias de macrófagos
 MIF - Factor inhibidor de la migración de macrófagos
 MIP-1α - Proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa
 mTOR - diana de rapamicina en mamíferos
 NAFLD – Enfermedad hepática grasa no alcohólica
 NEFAs - Ácidos grasos no esterificados
 NF-κB - Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
 NO - Óxido nítrico
 OMS – Organización mundial de la salud
 PAI-1 – Inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1
 PDH – Piruvato deshidrogenasa
 PDK - Piruvato deshidrogenasa quinasa
 PERK - *Proline-rich extensin-like receptor protein kinase*
 PGC-1α - Co-activador 1 alfa de receptores gamma activados por proliferador de peroxisomas

PI3 - Fosfoinositol 3
PI3K – Fosfoinositol 3-quinasa
PKB - Proteín quinasa B o Akt
PKC - Proteín quinasa C
PPARs - Receptores activadores del
proliferador de peroxisomas
PTEN - Proteína homóloga de la
fosfatasa y tensina
PTP1B - Proteína tirosina fosfatasa 1b
PTX3 – Pentraxina 3
RANTES - Quimiocina regulada a la
activación, expresada y secretada en
células T normales
SAT – Tejido adiposo subcutáneo
Ser - Serina
SOCS - Supresores de señalización de
citoquinas
STAT3 - Transductor de señal y
activador de transcripción 3
T2DM – Diabetes Mellitus tipo II
TACE - Enzima convertidora de TNF α
TAGs - Triglicéridos
TGF - Factor de crecimiento
transformante
TLR - Receptor tipo Toll
TNF- α – Factor de necrosis tumoral alfa
Tyr - Tirosina
UPR - Respuesta a proteínas
desplegadas
UV - Radiación ultravioleta
VAT – Tejido adiposo visceral
VEGFA - Factor de crecimiento
endotelial vascular A
VLDL – Lipoproteínas de muy baja
densidad
WAT - Tejido adiposo blanco
XBP-1 - Proteína de unión a X-box 1
Ym1 - Factor quimiotáctico de
eosinófilos derivado de linfocitos T

BIBLIOGRAFÍA

1. Després JP, Lemieux I (2006) Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 444: 881-887.
2. Alberti KG, Zimmet PZ (1998) Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 15: 539-553.
3. Fox CS, Massaro JM, Hoffmann U, Pou KM, Maurovich-Horvat P, et al. (2007) Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation* 116: 39-48.
4. Knights AJ, Funnell AP, Pearson RC, Crossley M, Bell-Anderson KS (2014) Adipokines and insulin action: A sensitive issue. *Adipocyte* 3: 88-96.
5. Lim S, Meigs JB (2013) Ectopic fat and cardiometabolic and vascular risk. *Int J Cardiol* 169: 166-176.
6. Rosito GA, Massaro JM, Hoffmann U, Ruberg FL, Mahabadi AA, et al. (2008) Pericardial fat, visceral abdominal fat, cardiovascular disease risk factors, and vascular calcification in a community-based sample: the Framingham Heart Study. *Circulation* 117: 605-613.
7. Manolopoulos KN, Karpe F, Frayn KN (2010) Gluteofemoral body fat as a determinant of metabolic health. *Int J Obes (Lond)* 34: 949-959.
8. Guerre-Millo M (2004) Adipose tissue and adipokines: for better or worse. *Diabetes Metab* 30: 13-19.
9. Odegaard JI, Chawla A (2008) Mechanisms of macrophage activation in obesity-induced insulin resistance. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 4: 619-626.
10. Calder PC, Ahluwalia N, Brouns F, Buetler T, Clement K, et al. (2011) Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. *Br J Nutr* 106 Suppl 3: S5-78.
11. Frayn KN, Humphreys SM, Coppack SW (1995) Fuel selection in white adipose tissue. *Proc Nutr Soc* 54: 177-189.
12. Saxena U, Witte LD, Goldberg IJ (1989) Release of endothelial cell lipoprotein lipase by plasma lipoproteins and free fatty acids. *J Biol Chem* 264: 4349-4355.
13. Sniderman AD, Cianflone K, Arner P, Summers LK, Frayn KN (1998) The adipocyte, fatty acid trapping, and atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18: 147-151.
14. Shen W, Wang Z, Punyanita M, Lei J, Sinav A, et al. (2003) Adipose tissue quantification by imaging methods: a proposed classification. *Obes Res* 11: 5-16.

15. Kabir M, Catalano KJ, Ananthnarayan S, Kim SP, Van Citters GW, et al. (2005) Molecular evidence supporting the portal theory: a causative link between visceral adiposity and hepatic insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: E454-461.
16. Ostman J, Arner P, Engfeldt P, Kager L (1979) Regional differences in the control of lipolysis in human adipose tissue. *Metabolism* 28: 1198-1205.
17. Mittelman SD, Van Citters GW, Kirkman EL, Bergman RN (2002) Extreme insulin resistance of the central adipose depot in vivo. *Diabetes* 51: 755-761.
18. Williamson JR (1966) Mechanism for the stimulation in vivo of hepatic gluconeogenesis by glucagon. *Biochem J* 101: 11C-14C.
19. Clarke SD (2000) Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a mechanism to improve energy balance and insulin resistance. *Br J Nutr* 83 Suppl 1: S59-66.
20. Oakes ND, Cooney GJ, Camilleri S, Chisholm DJ, Kraegen EW (1997) Mechanisms of liver and muscle insulin resistance induced by chronic high-fat feeding. *Diabetes* 46: 1768-1774.
21. Mittelman SD, Van Citters GW, Kim SP, Davis DA, Dea MK, et al. (2000) Longitudinal compensation for fat-induced insulin resistance includes reduced insulin clearance and enhanced beta-cell response. *Diabetes* 49: 2116-2125.
22. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB (2006) Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 116: 1793-1801.
23. Weber C, Noels H (2011) Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med* 17: 1410-1422.
24. McLaughlin T, Lamendola C, Liu A, Abbasi F (2011) Preferential fat deposition in subcutaneous versus visceral depots is associated with insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 96: E1756-1760.
25. Yim JE, Heshka S, Albu JB, Heymsfield S, Gallagher D (2008) Femoral-gluteal subcutaneous and intermuscular adipose tissues have independent and opposing relationships with CVD risk. *J Appl Physiol* (1985) 104: 700-707.
26. Staiger H, Tschritter O, Machann J, Thamer C, Fritsche A, et al. (2003) Relationship of serum adiponectin and leptin concentrations with body fat distribution in humans. *Obes Res* 11: 368-372.
27. Buemann B, Sørensen TI, Pedersen O, Black E, Holst C, et al. (2005) Lower-body fat mass as an independent marker of insulin sensitivity--the role of adiponectin. *Int J Obes (Lond)* 29: 624-631.

28. Tran TT, Kahn CR (2010) Transplantation of adipose tissue and stem cells: role in metabolism and disease. *Nat Rev Endocrinol* 6: 195-213.
29. Mortimore IL, Marshall I, Wraith PK, Sellar RJ, Douglas NJ (1998) Neck and total body fat deposition in nonobese and obese patients with sleep apnea compared with that in control subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 157: 280-283.
30. Preis SR, Massaro JM, Hoffmann U, D'Agostino RB, Levy D, et al. (2010) Neck circumference as a novel measure of cardiometabolic risk: the Framingham Heart study. *J Clin Endocrinol Metab* 95: 3701-3710.
31. Sacks HS, Fain JN (2007) Human epicardial adipose tissue: a review. *Am Heart J* 153: 907-917.
32. Iacobellis G, Leonetti F (2005) Epicardial adipose tissue and insulin resistance in obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 6300-6302.
33. Shimabukuro M, Hirata Y, Tabata M, Dagvasumberel M, Sato H, et al. (2013) Epicardial adipose tissue volume and adipocytokine imbalance are strongly linked to human coronary atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33: 1077-1084.
34. Iacobellis G, Lonn E, Lamy A, Singh N, Sharma AM (2011) Epicardial fat thickness and coronary artery disease correlate independently of obesity. *Int J Cardiol* 146: 452-454.
35. Mazurek T, Zhang L, Zalewski A, Mannion JD, Diehl JT, et al. (2003) Human epicardial adipose tissue is a source of inflammatory mediators. *Circulation* 108: 2460-2466.
36. Greif M, Becker A, von Ziegler F, Lebherz C, Lehrke M, et al. (2009) Pericardial adipose tissue determined by dual source CT is a risk factor for coronary atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29: 781-786.
37. Yudkin JS, Eringa E, Stehouwer CD (2005) "Vasocrine" signalling from perivascular fat: a mechanism linking insulin resistance to vascular disease. *Lancet* 365: 1817-1820.
38. Henrichot E, Juge-Aubry CE, Pernin A, Pache JC, Velebit V, et al. (2005) Production of chemokines by perivascular adipose tissue: a role in the pathogenesis of atherosclerosis? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 2594-2599.
39. Montani JP, Carroll JF, Dwyer TM, Antic V, Yang Z, et al. (2004) Ectopic fat storage in heart, blood vessels and kidneys in the pathogenesis of cardiovascular diseases. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28 Suppl 4: S58-65.

40. Reisin E, Jack AV (2009) Obesity and hypertension: mechanisms, cardio-renal consequences, and therapeutic approaches. *Med Clin North Am* 93: 733-751.
41. Lee YC, Chang HH, Chiang CL, Liu CH, Yeh JI, et al. (2011) Role of perivascular adipose tissue-derived methyl palmitate in vascular tone regulation and pathogenesis of hypertension. *Circulation* 124: 1160-1171.
42. García-Compeán D, Jáquez-Quintana JO, González-González JA, Lavallo-González FJ, Villarreal-Pérez JZ, et al. (2013) [Diabetes in liver cirrhosis]. *Gastroenterol Hepatol* 36: 473-482.
43. Meshkani R, Adeli K (2009) Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Clin Biochem* 42: 1331-1346.
44. Phillips DI, Caddy S, Ilic V, Fielding BA, Frayn KN, et al. (1996) Intramuscular triglyceride and muscle insulin sensitivity: evidence for a relationship in nondiabetic subjects. *Metabolism* 45: 947-950.
45. Unger RH (1995) Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications. *Diabetes* 44: 863-870.
46. Virkamäki A, Korshennikova E, Seppälä-Lindroos A, Vehkavaara S, Goto T, et al. (2001) Intramyocellular lipid is associated with resistance to in vivo insulin actions on glucose uptake, antilipolysis, and early insulin signaling pathways in human skeletal muscle. *Diabetes* 50: 2337-2343.
47. Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, Bell K, Barucci N, et al. (1999) Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes* 48: 1270-1274.
48. Shaw CS, Clark J, Wagenmakers AJ (2010) The effect of exercise and nutrition on intramuscular fat metabolism and insulin sensitivity. *Annu Rev Nutr* 30: 13-34.
49. Watt MJ, Heigenhauser GJ, Spriet LL (2002) Intramuscular triacylglycerol utilization in human skeletal muscle during exercise: is there a controversy? *J Appl Physiol* (1985) 93: 1185-1195.
50. Goodpaster BH, He J, Watkins S, Kelley DE (2001) Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: evidence for a paradox in endurance-trained athletes. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 5755-5761.
51. Hardin DS, Azzarelli B, Edwards J, Wigglesworth J, Maianu L, et al. (1995) Mechanisms of enhanced insulin sensitivity in endurance-trained athletes: effects on blood flow and differential expression of GLUT 4 in skeletal muscles. *J Clin Endocrinol Metab* 80: 2437-2446.

52. Kankaanpää M, Lehto HR, Pärkkä JP, Komu M, Viljanen A, et al. (2006) Myocardial triglyceride content and epicardial fat mass in human obesity: relationship to left ventricular function and serum free fatty acid levels. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 4689-4695.
53. Chiu HC, Kovacs A, Ford DA, Hsu FF, Garcia R, et al. (2001) A novel mouse model of lipotoxic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 107: 813-822.
54. Hill MJ, Metcalfe D, McTernan PG (2009) Obesity and diabetes: lipids, 'nowhere to run to'. *Clin Sci (Lond)* 116: 113-123.
55. Unger RH (2003) Lipid overload and overflow: metabolic trauma and the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol Metab* 14: 398-403.
56. Utz W, Engeli S, Haufe S, Kast P, Hermsdorf M, et al. (2011) Myocardial steatosis, cardiac remodelling and fitness in insulin-sensitive and insulin-resistant obese women. *Heart* 97: 1585-1589.
57. Rijzewijk LJ, van der Meer RW, Smit JW, Diamant M, Bax JJ, et al. (2008) Myocardial steatosis is an independent predictor of diastolic dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 52: 1793-1799.
58. Zeyda M, Stulnig TM (2009) Obesity, inflammation, and insulin resistance--a mini-review. *Gerontology* 55: 379-386.
59. Nishino N, Tamori Y, Kasuga M (2007) Insulin efficiently stores triglycerides in adipocytes by inhibiting lipolysis and repressing PGC-1 α induction. *Kobe J Med Sci* 53: 99-106.
60. Schenk S, Saberi M, Olefsky JM (2008) Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J Clin Invest* 118: 2992-3002.
61. Saltiel AR, Kahn CR (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414: 799-806.
62. Lodhi IJ, Chiang SH, Chang L, Vollenweider D, Watson RT, et al. (2007) Gapex-5, a Rab31 guanine nucleotide exchange factor that regulates Glut4 trafficking in adipocytes. *Cell Metab* 5: 59-72.
63. Boura-Halfon S, Zick Y (2009) Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296: E581-591.
64. Sesti G, Federici M, Hribal ML, Lauro D, Sbraccia P, et al. (2001) Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders. *FASEB J* 15: 2099-2111.
65. Zhou L, Chen H, Xu P, Cong LN, Sciacchitano S, et al. (1999) Action of insulin receptor substrate-3 (IRS-3) and IRS-4 to stimulate translocation of GLUT4 in rat adipose cells. *Mol Endocrinol* 13: 505-514.

66. Tsuruzoe K, Emkey R, Kriauciunas KM, Ueki K, Kahn CR (2001) Insulin receptor substrate 3 (IRS-3) and IRS-4 impair IRS-1- and IRS-2-mediated signaling. *Mol Cell Biol* 21: 26-38.
67. Kovacs P, Hanson RL, Lee YH, Yang X, Kobes S, et al. (2003) The role of insulin receptor substrate-1 gene (IRS1) in type 2 diabetes in Pima Indians. *Diabetes* 52: 3005-3009.
68. Rondinone CM, Wang LM, Lonroth P, Wesslau C, Pierce JH, et al. (1997) Insulin receptor substrate (IRS) 1 is reduced and IRS-2 is the main docking protein for phosphatidylinositol 3-kinase in adipocytes from subjects with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 4171-4175.
69. Lechleitner M (2008) Obesity and the metabolic syndrome in the elderly--a mini-review. *Gerontology* 54: 253-259.
70. Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW (2005) Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* 365: 1333-1346.
71. Gual P, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF (2005) Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie* 87: 99-109.
72. Karin M, Takahashi T, Kapahi P, Delhase M, Chen Y, et al. (2001) Oxidative stress and gene expression: the AP-1 and NF-kappaB connections. *Biofactors* 15: 87-89.
73. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Görgün CZ, Uysal KT, et al. (2002) A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420: 333-336.
74. Kim JK (2012) Endothelial nuclear factor kB in obesity and aging. *Circulation*. pp. 1081-1083.
75. Bachmann OP, Dahl DB, Brechtel K, Machann J, Haap M, et al. (2001) Effects of intravenous and dietary lipid challenge on intramyocellular lipid content and the relation with insulin sensitivity in humans. *Diabetes* 50: 2579-2584.
76. Bonen A, Parolin ML, Steinberg GR, Calles-Escandon J, Tandon NN, et al. (2004) Triacylglycerol accumulation in human obesity and type 2 diabetes is associated with increased rates of skeletal muscle fatty acid transport and increased sarcolemmal FAT/CD36. *FASEB J* 18: 1144-1146.
77. McGarry JD (2002) Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes* 51: 7-18.
78. Summers SA, Garza LA, Zhou H, Birnbaum MJ (1998) Regulation of insulin-stimulated glucose transporter GLUT4 translocation and Akt kinase activity by ceramide. *Mol Cell Biol* 18: 5457-5464.

79. Montell E, Turini M, Marotta M, Roberts M, Noé V, et al. (2001) DAG accumulation from saturated fatty acids desensitizes insulin stimulation of glucose uptake in muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280: E229-237.
80. Verma MK, Yateesh AN, Smitha R, Neelima K, Pallavi PM, et al. (2014) Integrated analysis of chronic lipotoxicity on muscle metabolism and stress and its reversal by antioxidants. *Springerplus* 3: 251.
81. Coleman RA, Lee DP (2004) Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog Lipid Res* 43: 134-176.
82. Sebastián D, Guitart M, García-Martínez C, Mauvezin C, Orellana-Gavaldà JM, et al. (2009) Novel role of FATP1 in mitochondrial fatty acid oxidation in skeletal muscle cells. *J Lipid Res* 50: 1789-1799.
83. Schenk S, Horowitz JF (2007) Acute exercise increases triglyceride synthesis in skeletal muscle and prevents fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 117: 1690-1698.
84. Monetti M, Levin MC, Watt MJ, Sajan MP, Marmor S, et al. (2007) Dissociation of hepatic steatosis and insulin resistance in mice overexpressing DGAT in the liver. *Cell Metab* 6: 69-78.
85. Kim JY, van de Wall E, Laplante M, Azzara A, Trujillo ME, et al. (2007) Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *J Clin Invest* 117: 2621-2637.
86. Summers SA (2006) Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Prog Lipid Res* 45: 42-72.
87. Hannun YA (1994) The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide. *J Biol Chem* 269: 3125-3128.
88. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, et al. (2006) TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 116: 3015-3025.
89. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, et al. (2007) Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56: 1761-1772.
90. Erridge C, Attina T, Spickett CM, Webb DJ (2007) A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation. *Am J Clin Nutr* 86: 1286-1292.
91. Saito H, Sherwood ER, Varma TK, Evers BM (2003) Effects of aging on mortality, hypothermia, and cytokine induction in mice with endotoxemia or sepsis. *Mech Ageing Dev* 124: 1047-1058.
92. Wellen KE, Hotamisligil GS (2005) Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 115: 1111-1119.

93. Makowski L, Hotamisligil GS (2004) Fatty acid binding proteins--the evolutionary crossroads of inflammatory and metabolic responses. *J Nutr* 134: 2464S-2468S.
94. Schwenk RW, Holloway GP, Luiken JJ, Bonen A, Glatz JF (2010) Fatty acid transport across the cell membrane: regulation by fatty acid transporters. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 82: 149-154.
95. Kazantzis M, Stahl A (2012) Fatty acid transport proteins, implications in physiology and disease. *Biochim Biophys Acta* 1821: 852-857.
96. Schaffer JE, Lodish HF (1994) Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell* 79: 427-436.
97. Stahl A, Evans JG, Pattel S, Hirsch D, Lodish HF (2002) Insulin causes fatty acid transport protein translocation and enhanced fatty acid uptake in adipocytes. *Dev Cell* 2: 477-488.
98. Hatch GM, Smith AJ, Xu FY, Hall AM, Bernlohr DA (2002) FATP1 channels exogenous FA into 1,2,3-triacyl-sn-glycerol and down-regulates sphingomyelin and cholesterol metabolism in growing 293 cells. *J Lipid Res* 43: 1380-1389.
99. Wiczer BM, Bernlohr DA (2009) A novel role for fatty acid transport protein 1 in the regulation of tricarboxylic acid cycle and mitochondrial function in 3T3-L1 adipocytes. *J Lipid Res* 50: 2502-2513.
100. Zhan T, Poppelreuther M, Eehalt R, Füllekrug J (2012) Overexpressed FATP1, ACSVL4/FATP4 and ACSL1 increase the cellular fatty acid uptake of 3T3-L1 adipocytes but are localized on intracellular membranes. *PLoS One* 7: e45087.
101. García-Martínez C, Marotta M, Moore-Carrasco R, Guitart M, Camps M, et al. (2005) Impact on fatty acid metabolism and differential localization of FATP1 and FAT/CD36 proteins delivered in cultured human muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 288: C1264-1272.
102. Guitart M, Andreu AL, García-Arumi E, Briones P, Quintana E, et al. (2009) FATP1 localizes to mitochondria and enhances pyruvate dehydrogenase activity in skeletal myotubes. *Mitochondrion* 9: 266-272.
103. Wu Q, Ortegon AM, Tsang B, Doege H, Feingold KR, et al. (2006) FATP1 is an insulin-sensitive fatty acid transporter involved in diet-induced obesity. *Mol Cell Biol* 26: 3455-3467.
104. Stefanyk LE, Bonen A, Dyck DJ (2012) Insulin and contraction-induced movement of fatty acid transport proteins to skeletal

- muscle transverse-tubules is distinctly different than to the sarcolemma. *Metabolism* 61: 1518-1522.
105. Holloway GP, Chou CJ, Lally J, Stellingwerff T, Maher AC, et al. (2011) Increasing skeletal muscle fatty acid transport protein 1 (FATP1) targets fatty acids to oxidation and does not predispose mice to diet-induced insulin resistance. *Diabetologia* 54: 1457-1467.
 106. Mashek DG, Coleman RA (2006) Cellular fatty acid uptake: the contribution of metabolism. *Curr Opin Lipidol* 17: 274-278.
 107. Kim JK, Gimeno RE, Higashimori T, Kim HJ, Choi H, et al. (2004) Inactivation of fatty acid transport protein 1 prevents fat-induced insulin resistance in skeletal muscle. *J Clin Invest* 113: 756-763.
 108. Matsufuji T, Ikeda M, Naito A, Hirouchi M, Takakusa H, et al. (2012) Discovery and optimization of novel fatty acid transport protein 1 (FATP1) inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 22: 5067-5070.
 109. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, et al. (2004) Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 306: 457-461.
 110. Hetz C, Chevet E, Harding HP (2013) Targeting the unfolded protein response in disease. *Nat Rev Drug Discov* 12: 703-719.
 111. Ozcan U, Yilmaz E, Ozcan L, Furuhashi M, Vaillancourt E, et al. (2006) Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science* 313: 1137-1140.
 112. Miller RS, Diaczok D, Cooke DW (2007) Repression of GLUT4 expression by the endoplasmic reticulum stress response in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 362: 188-192.
 113. Boslem E, Weir JM, MacIntosh G, Sue N, Cantley J, et al. (2013) Alteration of endoplasmic reticulum lipid rafts contributes to lipotoxicity in pancreatic β -cells. *J Biol Chem* 288: 26569-26582.
 114. Preston AM, Gurisik E, Bartley C, Laybutt DR, Biden TJ (2009) Reduced endoplasmic reticulum (ER)-to-Golgi protein trafficking contributes to ER stress in lipotoxic mouse beta cells by promoting protein overload. *Diabetologia* 52: 2369-2373.
 115. Fain JN (2006) Release of interleukins and other inflammatory cytokines by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily due to the nonfat cells. *Vitam Horm* 74: 443-477.
 116. Fantuzzi G (2005) Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 115: 911-919; quiz 920.
 117. Olefsky JM, Glass CK (2010) Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol* 72: 219-246.

118. Tajiri Y, Mimura K, Umeda F (2005) High-sensitivity C-reactive protein in Japanese patients with type 2 diabetes. *Obes Res* 13: 1810-1816.
119. Saghizadeh M, Ong JM, Garvey WT, Henry RR, Kern PA (1996) The expression of TNF alpha by human muscle. Relationship to insulin resistance. *J Clin Invest* 97: 1111-1116.
120. Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, Deem R, et al. (1995) The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest* 95: 2111-2119.
121. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM (1995) Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 95: 2409-2415.
122. Jager J, Grémeaux T, Cormont M, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF (2007) Interleukin-1beta-induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression. *Endocrinology* 148: 241-251.
123. Weigert C, Hennige AM, Lehmann R, Brodbeck K, Baumgartner F, et al. (2006) Direct cross-talk of interleukin-6 and insulin signal transduction via insulin receptor substrate-1 in skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 281: 7060-7067.
124. Cintra DE, Pauli JR, Araújo EP, Moraes JC, de Souza CT, et al. (2008) Interleukin-10 is a protective factor against diet-induced insulin resistance in liver. *J Hepatol* 48: 628-637.
125. Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li ZW, et al. (2005) IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med* 11: 191-198.
126. Wang B, Wood IS, Trayhurn P (2007) Dysregulation of the expression and secretion of inflammation-related adipokines by hypoxia in human adipocytes. *Pflugers Arch* 455: 479-492.
127. Semenza GL (2001) HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr Opin Cell Biol* 13: 167-171.
128. Chen C, Pore N, Behrooz A, Ismail-Beigi F, Maity A (2001) Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *J Biol Chem* 276: 9519-9525.
129. Rodríguez A, Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Frühbeck G (2007) Visceral and subcutaneous adiposity: are both potential therapeutic targets for tackling the metabolic syndrome? *Curr Pharm Des* 13: 2169-2175.

130. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, et al. (2005) Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res* 46: 2347-2355.
131. Huber J, Kiefer FW, Zeyda M, Ludvik B, Silberhumer GR, et al. (2008) CC chemokine and CC chemokine receptor profiles in visceral and subcutaneous adipose tissue are altered in human obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 93: 3215-3221.
132. Zeyda M, Farmer D, Todoric J, Aszmann O, Speiser M, et al. (2007) Human adipose tissue macrophages are of an anti-inflammatory phenotype but capable of excessive pro-inflammatory mediator production. *Int J Obes (Lond)* 31: 1420-1428.
133. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR (2007) Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 117: 175-184.
134. Clément K, Viguerie N, Poitou C, Carette C, Pelloux V, et al. (2004) Weight loss regulates inflammation-related genes in white adipose tissue of obese subjects. *FASEB J* 18: 1657-1669.
135. Kim JH, Kim JE, Liu HY, Cao W, Chen J (2008) Regulation of interleukin-6-induced hepatic insulin resistance by mammalian target of rapamycin through the STAT3-SOCS3 pathway. *J Biol Chem* 283: 708-715.
136. Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Red Eagle A, Vats D, Morel CR, et al. (2008) Alternative M2 activation of Kupffer cells by PPARdelta ameliorates obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab* 7: 496-507.
137. Wunderlich FT, Luedde T, Singer S, Schmidt-Supprian M, Baumgartl J, et al. (2008) Hepatic NF-kappa B essential modulator deficiency prevents obesity-induced insulin resistance but synergizes with high-fat feeding in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 1297-1302.
138. Sell H, Eckel J, Dietze-Schroeder D (2006) Pathways leading to muscle insulin resistance--the muscle--fat connection. *Arch Physiol Biochem* 112: 105-113.
139. Friedman JE, Kirwan JP, Jing M, Presley L, Catalano PM (2008) Increased skeletal muscle tumor necrosis factor-alpha and impaired insulin signaling persist in obese women with gestational diabetes mellitus 1 year postpartum. *Diabetes* 57: 606-613.
140. Lee B, Qiao L, Kinney B, Feng GS, Shao J (2014) Macrophage depletion disrupts immune balance and energy homeostasis. *PLoS One* 9: e99575.

141. Kosteli A, Sugaru E, Haemmerle G, Martin JF, Lei J, et al. (2010) Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue. *J Clin Invest* 120: 3466-3479.
142. Cook KS, Min HY, Johnson D, Chaplinsky RJ, Flier JS, et al. (1987) Adipsin: a circulating serine protease homolog secreted by adipose tissue and sciatic nerve. *Science* 237: 402-405.
143. Flier JS, Cook KS, Usher P, Spiegelman BM (1987) Severely impaired adipsin expression in genetic and acquired obesity. *Science* 237: 405-408.
144. White RT, Damm D, Hancock N, Rosen BS, Lowell BB, et al. (1992) Human adipsin is identical to complement factor D and is expressed at high levels in adipose tissue. *J Biol Chem* 267: 9210-9213.
145. Rosen BS, Cook KS, Yaglom J, Groves DL, Volanakis JE, et al. (1989) Adipsin and complement factor D activity: an immune-related defect in obesity. *Science* 244: 1483-1487.
146. Lo JC, Ljubicic S, Leibiger B, Kern M, Leibiger IB, et al. (2014) Adipsin is an adipokine that improves β cell function in diabetes. *Cell* 158: 41-53.
147. Steppan CM, Lazar MA (2004) The current biology of resistin. *J Intern Med* 255: 439-447.
148. Banerjee RR, Rangwala SM, Shapiro JS, Rich AS, Rhoades B, et al. (2004) Regulation of fasted blood glucose by resistin. *Science* 303: 1195-1198.
149. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, et al. (2001) The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409: 307-312.
150. Bokarewa M, Nagaev I, Dahlberg L, Smith U, Tarkowski A (2005) Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties. *J Immunol* 174: 5789-5795.
151. Lee JH, Chan JL, Yiannakouris N, Kontogianni M, Estrada E, et al. (2003) Circulating resistin levels are not associated with obesity or insulin resistance in humans and are not regulated by fasting or leptin administration: cross-sectional and interventional studies in normal, insulin-resistant, and diabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 4848-4856.
152. Lee JH, Bullen JW, Stoyneva VL, Mantzoros CS (2005) Circulating resistin in lean, obese, and insulin-resistant mouse models: lack of association with insulinemia and glycemia. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: E625-632.

153. Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW (2006) Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 443: 289-295.
154. Shimomura I, Hammer RE, Ikemoto S, Brown MS, Goldstein JL (1999) Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. *Nature* 401: 73-76.
155. Barr VA, Malide D, Zarnowski MJ, Taylor SI, Cushman SW (1997) Insulin stimulates both leptin secretion and production by rat white adipose tissue. *Endocrinology* 138: 4463-4472.
156. Kieffer TJ, Habener JF (2000) The adipoinsular axis: effects of leptin on pancreatic beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278: E1-E14.
157. Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, et al. (2006) Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 116: 1784-1792.
158. Yamauchi T, Kadowaki T (2008) Physiological and pathophysiological roles of adiponectin and adiponectin receptors in the integrated regulation of metabolic and cardiovascular diseases. *Int J Obes (Lond)* 32 Suppl 7: S13-18.
159. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, et al. (2001) The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med* 7: 941-946.
160. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Imai Y, Shimozawa N, et al. (2003) Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and ApoE-deficient mice from atherosclerosis. *J Biol Chem* 278: 2461-2468.
161. Ajuwon KM, Spurlock ME (2005) Adiponectin inhibits LPS-induced NF-kappaB activation and IL-6 production and increases PPARgamma2 expression in adipocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288: R1220-1225.
162. Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, et al. (2001) Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 1930-1935.
163. Mohan V, Deepa R, Pradeepa R, Vimalaswaran KS, Mohan A, et al. (2005) Association of low adiponectin levels with the metabolic syndrome--the Chennai Urban Rural Epidemiology Study (CURES-4). *Metabolism* 54: 476-481.

164. Hector J, Schwarzloh B, Goehring J, Strate TG, Hess UF, et al. (2007) TNF-alpha alters visfatin and adiponectin levels in human fat. *Horm Metab Res* 39: 250-255.
165. Hivert MF, Sullivan LM, Fox CS, Nathan DM, D'Agostino RB, et al. (2008) Associations of adiponectin, resistin, and tumor necrosis factor-alpha with insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 93: 3165-3172.
166. Bruun JM, Lihn AS, Verdich C, Pedersen SB, Toubro S, et al. (2003) Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285: E527-533.
167. Combs TP, Wagner JA, Berger J, Doebber T, Wang WJ, et al. (2002) Induction of adipocyte complement-related protein of 30 kilodaltons by PPARgamma agonists: a potential mechanism of insulin sensitization. *Endocrinology* 143: 998-1007.
168. Astapova O, Leff T (2012) Adiponectin and PPAR γ : cooperative and interdependent actions of two key regulators of metabolism. *Vitam Horm* 90: 143-162.
169. Mullen KL, Pritchard J, Ritchie I, Snook LA, Chabowski A, et al. (2009) Adiponectin resistance precedes the accumulation of skeletal muscle lipids and insulin resistance in high-fat-fed rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296: R243-251.
170. Wei Z, Peterson JM, Lei X, Cebotaru L, Wolfgang MJ, et al. (2012) C1q/TNF-related protein-12 (CTRP12), a novel adipokine that improves insulin sensitivity and glycemic control in mouse models of obesity and diabetes. *J Biol Chem* 287: 10301-10315.
171. Enomoto T, Ohashi K, Shibata R, Higuchi A, Maruyama S, et al. (2011) Adipolin/C1qdc2/CTRP12 protein functions as an adipokine that improves glucose metabolism. *J Biol Chem* 286: 34552-34558.
172. Wei Z, Lei X, Seldin MM, Wong GW (2012) Endopeptidase cleavage generates a functionally distinct isoform of C1q/tumor necrosis factor-related protein-12 (CTRP12) with an altered oligomeric state and signaling specificity. *J Biol Chem* 287: 35804-35814.
173. Schlöndorff J, Becherer JD, Blobel CP (2000) Intracellular maturation and localization of the tumour necrosis factor alpha convertase (TACE). *Biochem J* 347 Pt 1: 131-138.
174. Rosen ED, Spiegelman BM (2006) Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* 444: 847-853.
175. Rabe K, Lehrke M, Parhofer KG, Broedl UC (2008) Adipokines and insulin resistance. *Mol Med* 14: 741-751.

176. Osmand AP, Friedenson B, Gewurz H, Painter RH, Hofmann T, et al. (1977) Characterization of C-reactive protein and the complement subcomponent C1t as homologous proteins displaying cyclic pentameric symmetry (pentraxins). *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 739-743.
177. Bottazzi B, Vouret-Craviari V, Bastone A, De Gioia L, Matteucci C, et al. (1997) Multimer formation and ligand recognition by the long pentraxin PTX3. Similarities and differences with the short pentraxins C-reactive protein and serum amyloid P component. *J Biol Chem* 272: 32817-32823.
178. Introna M, Alles V, Castellano M, Picardi G, De Gioia L, et al. (1996) Cloning of mouse ptx3, a new member of the pentraxin gene family expressed at extrahepatic sites. *Blood* 87: 1862-1872.
179. Doni A, Michela M, Bottazzi B, Peri G, Valentino S, et al. (2006) Regulation of PTX3, a key component of humoral innate immunity in human dendritic cells: stimulation by IL-10 and inhibition by IFN-gamma. *J Leukoc Biol* 79: 797-802.
180. Breviario F, d'Aniello E, Golay J, Peri G, Bottazzi B, et al. (1992) Interleukin-1-inducible genes in endothelial cells. Cloning of a new gene related to C-reactive protein and serum amyloid P component. *J Biol Chem* 267: 22190-22197.
181. Abderrahim-Ferkoune A, Bezy O, Chiellini C, Maffei M, Grimaldi P, et al. (2003) Characterization of the long pentraxin PTX3 as a TNFalpha-induced secreted protein of adipose cells. *J Lipid Res* 44: 994-1000.
182. Chevillard G, Derjuga A, Devost D, Zingg H, Blank V (2007) Identification of interleukin-1beta regulated genes in uterine smooth muscle cells. *Reproduction* 134: 811-822.
183. Pepys M, Hirschfield G (2003) C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest* 111: 1805-1812.
184. Goodman A, Cardozo T, Abagyan R, Altmeyer A, Wisniewski H, et al. (1996) Long pentraxins: an emerging group of proteins with diverse functions. *Cytokine Growth Factor Rev* 7: 191-202.
185. Jaillon S, Peri G, Delneste Y, Frémaux I, Doni A, et al. (2007) The humoral pattern recognition receptor PTX3 is stored in neutrophil granules and localizes in extracellular traps. *J Exp Med* 204: 793-804.
186. Inforzato A, Peri G, Doni A, Garlanda C, Mantovani A, et al. (2006) Structure and function of the long pentraxin PTX3 glycosidic moiety: fine-tuning of the interaction with C1q and complement activation. *Biochemistry* 45: 11540-11551.

187. He X, Han B, Liu M (2007) Long pentraxin 3 in pulmonary infection and acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292: L1039-1049.
188. Bosutti A, Malaponte G, Zanetti M, Castellino P, Heer M, et al. (2008) Calorie restriction modulates inactivity-induced changes in the inflammatory markers C-reactive protein and pentraxin-3. *J Clin Endocrinol Metab* 93: 3226-3229.
189. Ogawa T, Kawano Y, Imamura T, Kawakita K, Sagara M, et al. (2010) Reciprocal Contribution of Pentraxin 3 and C-Reactive Protein to Obesity and Metabolic Syndrome. *Obesity* (Silver Spring).
190. Yamasaki K, Kurimura M, Kasai T, Sagara M, Kodama T, et al. (2009) Determination of physiological plasma pentraxin 3 (PTX3) levels in healthy populations. *Clin Chem Lab Med* 47: 471-477.
191. Miyaki A, Maeda S, Yoshizawa M, Misono M, Sasai H, et al. (2010) Is pentraxin 3 involved in obesity-induced decrease in arterial distensibility? *J Atheroscler Thromb* 17: 278-284.
192. Zanetti M, Bosutti A, Ferreira C, Vinci P, Biolo G, et al. (2009) Circulating pentraxin 3 levels are higher in metabolic syndrome with subclinical atherosclerosis: evidence for association with atherogenic lipid profile. *Clin Exp Med* 9: 243-248.
193. Alberti L, Gilardini L, Zulian A, Micheletto G, Peri G, et al. (2009) Expression of long pentraxin PTX3 in human adipose tissue and its relation with cardiovascular risk factors. *Atherosclerosis* 202: 455-460.
194. Gray SL, Vidal-Puig AJ (2007) Adipose tissue expandability in the maintenance of metabolic homeostasis. *Nutr Rev* 65: S7-12.
195. Northcott JM, Yeganeh A, Taylor CG, Zahradka P, Wigle JT (2012) Adipokines and the cardiovascular system: mechanisms mediating health and disease. *Can J Physiol Pharmacol* 90: 1029-1059.
196. Buechler C, Wanninger J, Neumeier M (2011) Adiponectin, a key adipokine in obesity related liver diseases. *World J Gastroenterol* 17: 2801-2811.
197. Aoki K, Sun YJ, Aoki S, Wada K, Wada E (2002) Cloning, expression, and mapping of a gene that is upregulated in adipose tissue of mice deficient in bombesin receptor subtype-3. *Biochem Biophys Res Commun* 290: 1282-1288.
198. Okada T, Nishizawa H, Kurata A, Tamba S, Sonoda M, et al. (2008) URB is abundantly expressed in adipose tissue and dysregulated in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 367: 370-376.

199. Tremblay F, Revett T, Huard C, Zhang Y, Tobin JF, et al. (2009) Bidirectional modulation of adipogenesis by the secreted protein Ccdc80/DRO1/URB. *J Biol Chem* 284: 8136-8147.
200. Tremblay F, Huard C, Dow J, Gareski T, Will S, et al. (2012) Loss of coiled-coil domain containing 80 negatively modulates glucose homeostasis in diet-induced obese mice. *Endocrinology* 153: 4290-4303.
201. Macotela Y, Emanuelli B, Mori MA, Gesta S, Schulz TJ, et al. (2012) Intrinsic differences in adipocyte precursor cells from different white fat depots. *Diabetes* 61: 1691-1699.
202. Ortega FJ, Mayas D, Moreno-Navarrete JM, Catalán V, Gómez-Ambrosi J, et al. (2010) The gene expression of the main lipogenic enzymes is downregulated in visceral adipose tissue of obese subjects. *Obesity (Silver Spring)* 18: 13-20.
203. Caserta F, Tchkonina T, Civelek VN, Prentki M, Brown NF, et al. (2001) Fat depot origin affects fatty acid handling in cultured rat and human preadipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280: E238-247.
204. Vatier C, Kadiri S, Muscat A, Chapron C, Capeau J, et al. (2012) Visceral and subcutaneous adipose tissue from lean women respond differently to lipopolysaccharide-induced alteration of inflammation and glyceroneogenesis. *Nutr Diabetes* 2: e51.
205. Leroyer S, Vatier C, Kadiri S, Quette J, Chapron C, et al. (2011) Glyceroneogenesis is inhibited through HIV protease inhibitor-induced inflammation in human subcutaneous but not visceral adipose tissue. *J Lipid Res* 52: 207-220.
206. Villaret A, Galitzky J, Decaunes P, Estève D, Marques MA, et al. (2010) Adipose tissue endothelial cells from obese human subjects: differences among depots in angiogenic, metabolic, and inflammatory gene expression and cellular senescence. *Diabetes* 59: 2755-2763.
207. Erusalimsky JD (2009) Vascular endothelial senescence: from mechanisms to pathophysiology. *J Appl Physiol* (1985) 106: 326-332.
208. Jernås M, Palming J, Sjöholm K, Jennische E, Svensson PA, et al. (2006) Separation of human adipocytes by size: hypertrophic fat cells display distinct gene expression. *FASEB J* 20: 1540-1542.
209. Norata G, Garlanda C, Catapano A (2010) The long pentraxin PTX3: a modulator of the immunoinflammatory response in atherosclerosis and cardiovascular diseases. *Trends Cardiovasc Med* 20: 35-40.

210. Mantovani A, Garlanda C, Doni A, Bottazzi B (2008) Pentraxins in innate immunity: from C-reactive protein to the long pentraxin PTX3. *J Clin Immunol* 28: 1-13.
211. Shim BJ, Jeon HK, Lee SJ, Kim SS, Park MY, et al. (2010) The Relationship Between Serum Pentraxin 3 and Central Obesity in ST-Segment Elevation Myocardial Infarction Patients. *Korean Circ J* 40: 308-313.
212. Alberti L, Gilardini L, Zulian A, Micheletto G, Peri G, et al. (2009) Expression of long pentraxin PTX3 in human adipose tissue and its relation with cardiovascular risk factors. *Atherosclerosis* 202: 455-460.
213. Nauta A, de Haij S, Bottazzi B, Mantovani A, Borrias M, et al. (2005) Human renal epithelial cells produce the long pentraxin PTX3. *Kidney Int* 67: 543-553.
214. Jensen MD, Haymond MW (1991) Protein metabolism in obesity: effects of body fat distribution and hyperinsulinemia on leucine turnover. *Am J Clin Nutr* 53: 172-176.
215. Pepys MB (1979) Isolation of serum amyloid P-component (protein SAP) in the mouse. *Immunology* 37: 637-641.
216. Basile A, Sica A, d'Aniello E, Breviario F, Garrido G, et al. (1997) Characterization of the promoter for the human long pentraxin PTX3. Role of NF-kappaB in tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta regulation. *J Biol Chem* 272: 8172-8178.
217. Melemedjian OK, Asiedu MN, Tillu DV, Peebles KA, Yan J, et al. (2010) IL-6- and NGF-induced rapid control of protein synthesis and nociceptive plasticity via convergent signaling to the eIF4F complex. *J Neurosci* 30: 15113-15123.
218. Ridker PM, Buring JE, Cook NR, Rifai N (2003) C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14 719 initially healthy American women. *Circulation* 107: 391-397.
219. Norata GD, Marchesi P, Pirillo A, Uboldi P, Chiesa G, et al. (2008) Long pentraxin 3, a key component of innate immunity, is modulated by high-density lipoproteins in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 925-931.
220. Alles VV, Bottazzi B, Peri G, Golay J, Inrona M, et al. (1994) Inducible expression of PTX3, a new member of the pentraxin family, in human mononuclear phagocytes. *Blood* 84: 3483-3493.
221. Souza DG, Soares AC, Pinho V, Torloni H, Reis LF, et al. (2002) Increased mortality and inflammation in tumor necrosis factor-

- stimulated gene-14 transgenic mice after ischemia and reperfusion injury. *Am J Pathol* 160: 1755-1765.
222. Breviario F, d'Aniello EM, Golay J, Peri G, Bottazzi B, et al. (1992) Interleukin-1-inducible genes in endothelial cells. Cloning of a new gene related to C-reactive protein and serum amyloid P component. *J Biol Chem* 267: 22190-22197.
223. Klouche M, Peri G, Knabbe C, Eckstein HH, Schmid FX, et al. (2004) Modified atherogenic lipoproteins induce expression of pentraxin-3 by human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 175: 221-228.
224. Ibrahim MM (2010) Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes Rev* 11: 11-18.
225. Insenser M, Montes-Nieto R, Vilarrasa N, Lecube A, Simó R, et al. (2012) A nontargeted proteomic approach to the study of visceral and subcutaneous adipose tissue in human obesity. *Mol Cell Endocrinol* 363: 10-19.
226. Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Rodríguez A, Frühbeck G (2012) Role of extracellular matrix remodelling in adipose tissue pathophysiology: relevance in the development of obesity. *Histol Histopathol* 27: 1515-1528.
227. Bommer GT, Jäger C, Dürr EM, Baehs S, Eichhorst ST, et al. (2005) DRO1, a gene down-regulated by oncogenes, mediates growth inhibition in colon and pancreatic cancer cells. *J Biol Chem* 280: 7962-7975.
228. Liu Y, Monticone M, Tonachini L, Mastrogiacomo M, Marigo V, et al. (2004) URB expression in human bone marrow stromal cells and during mouse development. *Biochem Biophys Res Commun* 322: 497-507.
229. Mócsai A (2013) Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J Exp Med* 210: 1283-1299.
230. Panee J (2012) Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) in obesity and diabetes. *Cytokine* 60: 1-12.
231. Kim CS, Park HS, Kawada T, Kim JH, Lim D, et al. (2006) Circulating levels of MCP-1 and IL-8 are elevated in human obese subjects and associated with obesity-related parameters. *Int J Obes (Lond)* 30: 1347-1355.
232. Kamei N, Tobe K, Suzuki R, Ohsugi M, Watanabe T, et al. (2006) Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *J Biol Chem* 281: 26602-26614.

233. Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, et al. (2006) MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest* 116: 1494-1505.
234. Li Y, Liu L, Wang B, Wang J, Chen D (2014) Simple steatosis is a more relevant source of serum inflammatory markers than omental adipose tissue. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 38: 46-54.
235. Targher G, Bertolini L, Rodella S, Lippi G, Franchini M, et al. (2008) NASH predicts plasma inflammatory biomarkers independently of visceral fat in men. *Obesity (Silver Spring)* 16: 1394-1399.
236. Corrado E, Rizzo M, Coppola G, Fattouch K, Novo G, et al. (2010) An update on the role of markers of inflammation in atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 17: 1-11.
237. Lewis SE, Listenberger LL, Ory DS, Schaffer JE (2001) Membrane topology of the murine fatty acid transport protein 1. *J Biol Chem* 276: 37042-37050.
238. Lobo S, Wiczler BM, Smith AJ, Hall AM, Bernlohr DA (2007) Fatty acid metabolism in adipocytes: functional analysis of fatty acid transport proteins 1 and 4. *J Lipid Res* 48: 609-620.
239. De Pinto V, Messina A, Lane DJ, Lawen A (2010) Voltage-dependent anion-selective channel (VDAC) in the plasma membrane. *FEBS Lett* 584: 1793-1799.
240. Marotta M, Ferrer-Martnez A, Parnau J, Turini M, Macé K, et al. (2004) Fiber type- and fatty acid composition-dependent effects of high-fat diets on rat muscle triacylglyceride and fatty acid transporter protein-1 content. *Metabolism* 53: 1032-1036.
241. Chiu HC, Kovacs A, Blanton RM, Han X, Courtois M, et al. (2005) Transgenic expression of fatty acid transport protein 1 in the heart causes lipotoxic cardiomyopathy. *Circ Res* 96: 225-233.
242. Cotter DG, Schugar RC, Crawford PA (2013) Ketone body metabolism and cardiovascular disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*.
243. Seifert EL, Fiehn O, Bezaire V, Bickel DR, Wohlgemuth G, et al. (2010) Long-chain fatty acid combustion rate is associated with unique metabolite profiles in skeletal muscle mitochondria. *PLoS One* 5: e9834.
244. Mascaró C, Buesa C, Ortiz JA, Haro D, Hegardt FG (1995) Molecular cloning and tissue expression of human mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase. *Arch Biochem Biophys* 317: 385-390.

245. Puisac B, Ramos M, Arnedo M, Menao S, Gil-Rodríguez MC, et al. (2012) Characterization of splice variants of the genes encoding human mitochondrial HMG-CoA lyase and HMG-CoA synthase, the main enzymes of the ketogenesis pathway. *Mol Biol Rep* 39: 4777-4785.
246. Fink G, Desrochers S, Des Rosiers C, Garneau M, David F, et al. (1988) Pseudoketogenesis in the perfused rat heart. *J Biol Chem* 263: 18036-18042.
247. Rodríguez JC, Gil-Gómez G, Hegardt FG, Haro D (1994) Peroxisome proliferator-activated receptor mediates induction of the mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene by fatty acids. *J Biol Chem* 269: 18767-18772.
248. An J, Muoio DM, Shiota M, Fujimoto Y, Cline GW, et al. (2004) Hepatic expression of malonyl-CoA decarboxylase reverses muscle, liver and whole-animal insulin resistance. *Nat Med* 10: 268-274.
249. Wentz AE, d'Avignon DA, Weber ML, Cotter DG, Doherty JM, et al. (2010) Adaptation of myocardial substrate metabolism to a ketogenic nutrient environment. *J Biol Chem* 285: 24447-24456.
250. Weidemann MJ, Krebs HA (1969) The fuel of respiration of rat kidney cortex. *Biochem J* 112: 149-166.
251. Holness MJ, Kraus A, Harris RA, Sugden MC (2000) Targeted upregulation of pyruvate dehydrogenase kinase (PDK)-4 in slow-twitch skeletal muscle underlies the stable modification of the regulatory characteristics of PDK induced by high-fat feeding. *Diabetes* 49: 775-781.
252. Sugden MC, Holness MJ (2003) Recent advances in mechanisms regulating glucose oxidation at the level of the pyruvate dehydrogenase complex by PDKs. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284: E855-862.
253. Jeong JY, Jeoung NH, Park KG, Lee IK (2012) Transcriptional regulation of pyruvate dehydrogenase kinase. *Diabetes Metab J* 36: 328-335.
254. Jeoung NH, Harris RA (2008) Pyruvate dehydrogenase kinase-4 deficiency lowers blood glucose and improves glucose tolerance in diet-induced obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295: E46-54.
255. Peters SJ, Harris RA, Wu P, Pehleman TL, Heigenhauser GJ, et al. (2001) Human skeletal muscle PDH kinase activity and isoform expression during a 3-day high-fat/low-carbohydrate diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281: E1151-1158.

256. Chakravarthy MV, Lodhi IJ, Yin L, Malapaka RR, Xu HE, et al. (2009) Identification of a physiologically relevant endogenous ligand for PPARalpha in liver. *Cell* 138: 476-488.
257. Muoio DM (2010) Intramuscular triacylglycerol and insulin resistance: guilty as charged or wrongly accused? *Biochim Biophys Acta* 1801: 281-288.