

**UNIVERSIDAD DE BARCELONA**  
**FACULTAD DE FARMACIA**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**RESISTENCIA A LA INSULINA INDUCIDA POR  
ÁCIDOS GRASOS EN CÉLULAS DE MÚSCULO  
ESQUELÉTICO L6E9: PAPEL DE LA CARNITINA  
PALMITOILTRANSFERASA I (CPT I)**

**DAVID SEBASTIÁN MUÑOZ**

**2006**



UNIVERSIDAD DE BARCELONA  
FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR  
PROGRAMA DE DOCTORADO: BIOMEDICINA  
BIENIO 2000-2002

**RESISTENCIA A LA INSULINA INDUCIDA POR  
ÁCIDOS GRASOS EN CÉLULAS DE MÚSCULO  
ESQUELÉTICO L6E9: PAPEL DE LA CARNITINA  
PALMITOILTRANSFERASA I (CPT I)**

Memoria presentada por David Sebastián Muñoz para optar al grado de Doctor por la  
Universidad de Barcelona.

Directora de Tesis: Dra. Guillermina Asins Muñoz

David Sebastián Muñoz

DAVID SEBASTIÁN MUÑOZ

2006



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mis directores de tesis todo su esfuerzo y dedicación para que esta tesis haya podido tener lugar. Al Prof. Fausto García Hegardt por permitirme realizar la tesis en su grupo y por abrirme el camino a la investigación, que desde muy pequeño siempre me ha entusiasmado. A Guillermina Asins por su dinamismo, buen humor y por todo aquello que me ha enseñado sin darse cuenta. A Dolors Serra por que siempre que la he necesitado ha estado a mi lado, por su amabilidad y por sus consejos científicos.

Quisiera dar las gracias a todos los compañeros de grupo durante todos estos años, porque al final se han convertido en mis amigos. En primer lugar quiero dar las gracias a Eva por haber iniciado conmigo esta aventura y haberme acompañado en los primeros momentos. Gracias Laura por haber sido la primera en aguantarme y por enseñarme tantas cosas, por compartir mis manías por el orden y la limpieza y por toda tu ayuda en los momentos más duros. Gracias Blanca por tus cariñosas palabras, gracias Ruth por hacer más amenas las primeras tardes, gracias Montse por tu paciencia, generosidad, por tus consejos y por ser como eres. Gracias Assia por aguantarme al lado siempre con una sonrisa, y por ser una compañera de poyata ideal. Gracias Judith por tu ayuda y buen humor. Gracias Guillem por los momentos de desconexión on-line y Toni por ayudarme cuando lo he necesitado. Gracias Irene por mostrarte como eres y haberme permitido conocerte. Gracias Yolanda por tu simpatía, buen humor y por compartir tantas bromas y chorradas conmigo. Gracias Chandru por enseñarme otra forma de ver la vida, gracias Caroline por tu ayuda en la última etapa de mi tesis y gracias Nuria por esos virus tan potentes. Quisiera agradecer a todos en general el permitir y colaborar a que siempre haya habido un clima excelente en el laboratorio.

Quiero dar las gracias también a todos los demás grupos del departamento por su ayuda en algún momento de la tesis. Entre ellos quisiera destacar a Gisela, porque siempre ha estado ahí aún cuando no eran buenos momentos para ella. También quisiera agradecer a todos aquellos con los que he compartido prácticas, porque de todos ellos he aprendido alguna cosa. Gracias a Mari Carmen, Jordi, Tina y Brugués por su ayuda con los papeles, y a Silvia porque desde tu llegada el departamento ha cambiado.

Quiero dar las gracias al Prof. Gerald I. Shulman por darme la oportunidad de realizar una estancia en su laboratorio. Gracias Taro y Susi por enseñarme los “ins and outs” de los clamps y por demostrarme que es posible hacer muy buenos amigos en poco tiempo. Y por supuesto de esta etapa de mi tesis no puedo olvidar a Gloria. Gracias por compartir esos momentos alejado de mi familia, por compartir conmigo tantas confesiones, por ser mi amiga y por que sin saberlo me has ayudado mucho más de lo que imaginas. Gracias a ti también Josep por tu amistad.

Gracias Carlos por vivir conmigo esta pasión por la ciencia, por tu ayuda y asesoramiento en muchas ocasiones, por tu confianza y porque espero que siempre podamos ayudarnos el uno al otro. Gracias a ti también Pedro, por compartir conmigo todas las penas y problemas desde que nos conocimos en la carrera, por mostrarme siempre tu amistad, por esos momentos compartidos en “las mesas” donde hemos solucionado muchos problemas, algunos científicos y otros no tanto. Gracias Sergi por compartir conmigo aficiones, deportes y haber sido mi compañero de desahogo los martes por la mañana. Gracias también a Laia, Pili, Eva, Eli, Quim, Tatiana e Iván por haber compartido conmigo comidas y buenos momentos.

A mis “nenes” Jordi, Riad, Rubén, y Evaristo (y al peque), a Jose Luís, Vero, Juan, y Damian por ampliar la familia de los locos del laboratorio y por compartir tantos buenos momentos, comilonas y excursiones. Gracias Rulu y Cristina por vuestra amistad y permitirme “meditar” en vuestro sofá tantas veces. Gracias también a Carlos, Cristina, Sergio, Maite, Sergio (Mingui), Ainhoa y Bea por los buenos momentos pasados durante estos años aquí y en Estercuel y que tanto me han ayudado para desconectar.

Gracias a Zoilo y Olalla por su total comprensión y solidaridad, por haber entendido como vivimos los científicos y por hacerme sentir siempre como en mi casa. En general gracias a mi otra familia por haberme acogido como uno más. Gracias también a los peques: Raquel, Alba, Sofía, Martí y Joan.

Gracias a mi familia por todo. A mi padre por enseñarme la constancia, la fuerza de voluntad y la capacidad de superación día tras día, y que todo es posible si te lo

propones. Gracias a mi madre por su paciencia, cariño y dedicación. Gracias a vosotros he podido llegar hasta aquí y ser lo que soy. A vosotros os lo debo todo. Gracias también a mis hermanos, Ana, Joaquín, Carlos, Toribio y parejas, Lorenzo, Marta, María y Susi por estar ahí y darme alegrías (algunas tienen nombre propio, como Marina y Paula). Gracias también a mis abuelos y tíos por quererme y estar a mi lado.

Finalmente a ti Isabel, porque tu vida conmigo ha ido paralela a esta tesis, creo que una parte de esta tesis es también tuya. Tú más que nadie has sufrido mis desilusiones y mis momentos bajos. Gracias por estar a mi lado, por quererme, por comprenderme y apoyarme, por aguantar los momentos difíciles, por tu paciencia y por tu dedicación. Espero poder agradecerte siempre todo.

Este trabajo ha sido realizado con la ayuda de la beca de Formació en la Recerca y Docència de la Universidad de Barcelona, la beca de colaboración en proyectos de investigación del IRBB-PCB, y la ayuda para la finalización de la tesis doctoral de la Facultad de Farmacia.

David.





*A mis padres, Joaquín y Rosa,  
y a mi mujer, Isabel.*



## ABREVIATURAS

ACBP	Proteína de unión a aciles-CoA
ACC	Acetil-CoA carboxilasa
ACS	Acil-CoA sintetasa
AG	Ácido graso
AgRP	<i>Agouti related protein</i>
AICAR	5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido
AMP	Adenosina monofosfato
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP
ASP	Productos solubles ácidos
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albúmina sérica bovina
CACT	Carnitina:acil carnitina translocasa
CAPP	Proteína fosfatasa activada por ceramida
CART	Tránsito regulado por cocaína-anfetamina
CAT	Carnitina acetiltransferasa
cDNA	DNA complementario
Ci	Curio
ChAT	Colina acetiltransferasa
CoA	Coenzima A
COT	Carnitina octanoiltransferasa
cpm	cuentas por minuto
CPT	Carnitina palmitoiltransferasa
DAG	Diacilglicerol
DETAPAC	Ácido dietilentriamino pentaacético
DIO	Obeso inducido por dieta
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTE	Ditioeritrol
DTT	Ditiotreitrol
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético
EGTA	Ácido etilenglicol-bis (aminoeltileter)-N,N,N',N'-tetraacético

EMCL	Lípidos extramiocelulares
FABPc	Proteína de unión a ácidos grasos citosólica
FABPpm	Proteína de unión a ácidos grasos de membrana plasmática
FAS	Ácido graso sintasa
FAT	Transportador de ácidos grasos
FATP	Proteína transportadora de ácidos grasos
FBS	Suero fetal bovino
GFAT	Glutamina:fructosa-6-fosfato amidotransferasa
GLUT	Transportador de glucosa
GS	Glucógeno sintasa
GSH	Glutación reducido
GSK	Glucógeno sintasa quinasa
h	Hora
HEK	Riñón de embrión humano
HEPES	Ácido N-(2-hidroxiethyl)piperazina-N'-2-etanosulfónico
HNF	Factor nuclear de hepatocitos
ICV	Intracerebroventricular
ID	Diámetro interno
IDDM	Diabetes mellitus dependiente de insulina
I $\kappa$ B	Inhibidor del complejo NF- $\kappa$ B
IKK	Quinasa del inhibidor I $\kappa$ B
IMCL	Lípidos intramiocelulares
IMTG	Triglicéridos intramusculares
IL-6	Interleuquina 6
ip	Intraperitoneal
IR	Receptor de la insulina
IRS	Sustrato del receptor de la insulina
JNK	<i>Jun kinase</i>
K <sub>m</sub>	Constante de Michaelis
KDa	KiloDalton
KRBH	Krebs-Ringer bicarbonato Hepes
LCACoA	Acil-CoA de cadena larga
LCAS	Sintetasa de aciles-CoA de cadena larga

M	Molar (mol/l)
mA	Miliamperios
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MBP	Proteína básica de mielina
MCD	Malonil-CoA descarboxilasa
MIDD	Diabetes mellitus asociada a herencia materna y sordera
MME	Membrana mitocondrial externa
MMI	Membrana mitocondrial interna
min	minuto
ml	mililitro
MODY	<i>Maturity onset diabetes of the young</i>
moi	multiplicidad de infección
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NADH	Dinucleótido de adenina y nicotinamida (forma reducida)
NIDDM	Diabetes mellitus no dependiente de insulina
NF-kB	Factor nuclear kB
NPY	Neuropéptido Y
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PalNe	Palmitato no esterificado
PBS	Tampón fosfato-salino
PDH	Piruvato deshidrogenasa
PDK	Quinasa dependiente de fosfoinositoles
pfu	Unidades formadoras de calvas víricas
PFK	Fosfofructoquinasa
PI3K	fosfoinositol-3-fosfato quinasa
PIP <sub>2</sub>	Fosfoinositol difosfato
PIP <sub>3</sub>	Fosfoinositol trifosfato
PKB	Proteína quinasa B
PKC	Proteína quinasa C
PL	Fosfolípido
POMC	Proopiomelanocortina
PP2A	Proteína fosfatasa 2A
PPAR	Receptor activado por proliferadores peroxisomales
PPRE	Elemento de respuesta a PPAR

PTP	Proteína tirosina fosfatasa
R.E.	Radiactividad específica
Rf	Factor de retención
RMN	Resonancia magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
RXR	<i>Retinoid X receptor</i>
SDS	Sodio dodecilsulfato
SOCS	Supresor de la señalización de citoquinas
SSO	Sulfo-N-succimidil oleato
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
TG	Triglicéridos
TLC	Cromatografía en capa fina
TNF $\alpha$	<i>Tumor necrosis factor-<math>\alpha</math></i>
TOFA	Ácido 5-(tetradeciloxi)-2-furoico
Tris	Tris(hidroxietil)aminoetano
TZD	Tiazolidindiona
UCP	Proteína desacopladora

## PRESENTACIÓN

La resistencia a la insulina es un estado patológico que se define como la incapacidad del organismo de responder normalmente a las acciones de la insulina. Este estado está ligado a la obesidad, al estilo sedentario de vida y es responsable en gran medida de la aparición de la diabetes de tipo 2. Aunque tradicionalmente el estudio de esta patología se había centrado en el metabolismo de carbohidratos, en las últimas décadas se ha producido un cambio hacia el estudio del metabolismo de ácidos grasos como principal promotor de esta enfermedad. De este modo, se ha demostrado una correlación entre la acumulación de lípidos en tejidos periféricos (hígado y músculo principalmente) y la aparición de resistencia a la insulina.

El músculo es el responsable de la mayor parte del metabolismo de la glucosa en situaciones de estimulación por insulina. Esto confiere al músculo una vital importancia en el desarrollo de la resistencia a la insulina así como para el tratamiento de la diabetes de tipo 2. Numerosos estudios han descrito que la acumulación de especies derivadas de ácidos grasos en músculo, ya sea debido a un aporte excesivo de lípidos o a un fallo en su oxidación, conducen a una resistencia a la insulina. Estas especies derivadas de ácidos grasos actúan interfiriendo en la señalización de la insulina mediante la activación de una serie de proteínas, conduciendo a una desensibilización del músculo a las acciones de la insulina.

En esta tesis se ha estudiado si un aumento en la oxidación de ácidos grasos en músculo es capaz de impedir la acumulación de sus derivados lipídicos y por lo tanto evitar la resistencia a la insulina ocasionada por ellos. Con este objetivo se han usado dos aproximaciones experimentales. En primer lugar, se ha evaluado el efecto de la sobreexpresión de la carnitina palmitoiltransferasa I (CPT I), que es la enzima responsable del control del transporte de ácidos grasos a la mitocondria, donde serán oxidados, y en segundo lugar, se ha estudiado el efecto del C75, un activador de la CPT I recientemente descrito. Además, también se ha estudiado el papel de otra proteína recientemente involucrada en el control de la oxidación de ácidos grasos en músculo, la FAT/CD36. Todo esto se ha llevado a cabo usando como modelo de estudio células de músculo esquelético de rata L6E9.

Los resultados presentados en esta tesis demuestran que la sobreexpresión de CPT I ha resultado efectiva en el aumento de la oxidación de ácidos grasos, impidiendo

su acumulación y por lo tanto protegiendo a la célula de la resistencia a la insulina. En cambio, se ha demostrado que el C75, a través de su activación a C75-CoA, se comporta como un inhibidor de la CPT I y por lo tanto de la oxidación de ácidos grasos en músculo esquelético. Por último, no se ha podido demostrar que FAT/CD36 juegue un papel importante en la oxidación de ácidos grasos en las condiciones de estudio utilizadas.

Estos resultados confirman la importancia del metabolismo lipídico en la resistencia a la insulina en músculo y describen la CPT I como una posible diana farmacológica para el tratamiento de la resistencia a la insulina y la diabetes de tipo 2. Por otro lado describen una nueva acción del C75 sobre la actividad CPT I y sugieren la necesidad de realizar más estudios para esclarecer el papel de FAT/CD36 en la oxidación de ácidos grasos en músculo esquelético.



# ÍNDICE

## INTRODUCCIÓN

<b>1. DIABETES</b>	<b>1</b>
1.1. Diabetes de tipo 1	3
1.2. Diabetes de tipo 2	3
1.2.1. Formas monogénicas de diabetes de tipo 2	5
<b>2. RESISTENCIA A LA INSULINA</b>	<b>5</b>
2.1. Resistencia a la insulina en músculo	7
2.1.1. Transducción de la señal de la insulina en músculo esquelético	7
2.1.2. Mecanismos implicados en la inhibición de la transducción de señal de la insulina	10
2.2. Resistencia a la insulina inducida por ácidos grasos	13
2.2.1. Especies lipídicas involucradas en la resistencia a la insulina en músculo	15
2.2.2. Efectos de los ácidos grasos en la biosíntesis de hexosaminas y resistencia a la insulina	19
2.3. Resistencia a la insulina y obesidad	20
2.4. Resistencia a la insulina e inflamación	23
2.5. Estrategias terapéuticas en el tratamiento de la resistencia a la insulina	25
2.5.1. Reducción de lípidos intramiocelulares	26
2.5.2. Modulación de las vías proinflamatorias	28
<b>3. METABOLISMO DE ÁCIDOS GRASOS EN MÚSCULO ESQUELÉTICO</b>	<b>29</b>
3.1. Utilización de lípidos en músculo en reposo y durante ejercicio	29
3.2. Regulación del metabolismo de lípidos en músculo esquelético	30
3.2.1. Transporte de ácidos grasos dentro de la célula muscular	32
3.2.2. Lisis de los triglicéridos intramiocelulares (IMTG)	34
3.2.3. Activación de ácidos grasos a aciles-CoA	35
3.2.4. Transporte de ácidos grasos a través del citoplasma	36
3.2.5. Metabolismo de ácidos grasos en la mitocondria	37

<b>4. SISTEMA CARNITINA PALMITOILTRANSFERASA</b>	<b>39</b>
4.1. Regulación de la CPT I	42
4.1.1. Regulación a nivel transcripcional	42
4.1.2. Regulación por malonil-CoA	43
4.1.2.1. Pérdida de la sensibilidad al malonil-CoA: mutación de la metionina 593	44
4.1.3. Regulación independiente de malonil-CoA	45
4.1.4. Regulación farmacológica	46
4.2. Regulación de la CPT I en músculo esquelético	47
<b>5. DESREGULACIÓN DEL METABOLISMO DE ÁCIDOS GRASOS EN MÚSCULO Y RESISTENCIA A LA INSULINA</b>	<b>50</b>
<b>6. C75, EL INHIBIDOR DE LA ÁCIDO GRASO SINTASA</b>	<b>54</b>
6.1. El C75 como agente antitumoral	55
6.2. Efecto central del C75	56
6.3. Efecto periférico del C75	58
<b>OBJETIVOS</b>	<b>63</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
<b>1. ANIMALES</b>	<b>67</b>
1.1. Tratamientos	67
<b>2. CULTIVOS CELULARES</b>	<b>67</b>
2.1. Soluciones y procedimientos básicos en cultivos celulares	68
2.2. Células L6E9	69
2.3. Células HEK 293	70
2.4. Tratamientos celulares	71
2.5. Viabilidad celular	73
<b>3. ADENOVIRUS</b>	<b>74</b>
3.1. Biología del adenovirus	74
3.2. Manipulación de adenovirus como herramienta de transferencia genética	77
3.2.1. Amplificación de adenovirus	77
3.2.2. Titulación de adenovirus	78
3.2.3. Infección con adenovirus	79

<b>4. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS</b>	<b>80</b>
4.1.- Determinación de la concentración proteica por el método de Bradford	80
4.2.- Western Blot	80
<b>5. ENSAYO DE ACTIVIDAD CPT I</b>	<b>86</b>
5.1. Obtención de fracciones enriquecidas en mitocondrias	86
5.1.1. Obtención de mitocondrias a partir de células en cultivo	86
5.1.2. Obtención de mitocondrias a partir de músculo ratón	87
5.2. Ensayo de actividad CPT I	87
5.3. Ensayo de inhibición por malonil-CoA	90
5.4. Ensayo de inhibición por etomoxiril-CoA	91
5.5. Actividad CPT I en presencia de C75	91
<b>6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD Akt/PKB</b>	<b>92</b>
<b>7. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PKC <math>\theta</math> Y PKC <math>\zeta</math></b>	<b>93</b>
<b>8. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD <math>\beta</math>-GALACTOSIDASA</b>	<b>96</b>
<b>9. DETERMINACIONES DEL METABOLISMO CELULAR</b>	<b>97</b>
9.1. Metabolismo de ácidos grasos	97
9.1.1. Transporte de ácidos grasos	97
9.1.2. Oxidación de ácidos grasos	98
9.1.3. Incorporación de ácidos grasos a lípidos intracelulares	105
9.2. Metabolismo de la glucosa	107
9.2.1. Transporte de glucosa	107
9.2.2. Síntesis de glucógeno	110
<b>10. DETERMINACIONES DE METABOLITOS</b>	<b>111</b>
10.1. Determinación de triglicéridos	111
10.2. Determinación de ceramidas y diacilglicerol	112
<b>11. ESPECTROMETRÍA DE MASAS</b>	<b>115</b>

## **RESULTADOS**

### **1. EFECTO DE LA SOBREENPRESIÓN DE LCPT I EN LA RESISTENCIA A LA INSULINA INDUCIDA POR ÁCIDOS GRASOS EN MÚSCULO ESQUELÉTICO**

1.1. Trasducción de células L6E9	119
----------------------------------	-----

1.2. Actividad CPT I en células L6E9 infectadas con Ad-LCPT I wt y Ad-LCPT I M593S	120
1.2.1. Actividad CPT I en células L6E9 infectadas con diferentes cantidades de Ad-LCPT I wt y Ad-LCPT I M593S	120
1.2.2. Inhibición de la actividad CPT I por malonil-CoA en células infectadas con Ad-LCPT I wt y Ad-LCPT I M593S	122
1.3. Niveles de proteína LCPT I en células L6E9 infectadas con Ad-LPT I wt y Ad-LCPT I M593S	123
1.4. Efecto de la sobreexpresión de LCPT I en la oxidación de ácidos grasos	125
1.5. Efecto de la sobreexpresión de LCPT I en la incorporación de ácidos grasos a lípidos celulares	132
1.6. Efecto de la sobreexpresión de LCPT I en los niveles celulares de metabolitos derivados de ácidos grasos	135
1.6.1. Niveles celulares de triglicéridos	135
1.6.2. Niveles de DAG y ceramidas	136
1.7. Efecto de la sobreexpresión de LCPT I en el metabolismo de glucosa estimulado por insulina	137
1.7.1. Captación de glucosa estimulada por insulina	137
1.7.2. Síntesis de glucógeno estimulada por insulina	138
1.8. Efecto de la sobreexpresión de LCPT I en la actividad Akt/PKB	139
1.9. Efecto de la sobreexpresión de LCPT I en la actividad PKC $\theta$ y PKC $\zeta$	141

<b>2. EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE FAT/CD36 EN LA OXIDACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN CÉLULAS MUSCULARES L6E9</b>	<b>143</b>
2.1. Niveles de proteína FAT/CD36 en células L6E9 infectadas con Ad-FAT/CD36	143
2.2. Captación de palmitato en células L6E9 que sobreexpresan FAT/CD36	144
2.3. Incorporación de palmitato a lípidos celulares en células infectadas con Ad-FAT/CD36	145
2.4. Efecto de la sobreexpresión de FAT/CD36 en la oxidación de palmitato en células L6E9	146

<b>3. EFECTO DEL C75 EN LA ACTIVIDAD CPT I Y EN LA OXIDACIÓN DE PALMITATO EN CÉLULAS MUSCULARES L6E9</b>	<b>148</b>
3.1. Análisis del C75-CoA por MALDI-TOF	148
3.2. Efecto del C75 en la actividad CPT I en células L6E9 y en fracciones enriquecidas en mitocondrias	151
3.3. Efecto del C75 en la oxidación de palmitato en células L6E9	153
3.4. Viabilidad celular	154
3.5. Efecto del C75 <i>in vivo</i> en músculo de ratón	155

## **DISCUSIÓN**

<b>1. EFECTO DE LA SOBREENPRESIÓN DE LCPT I EN LA RESISTENCIA A LA INSULINA INDUCIDA POR ÁCIDOS GRASOS EN MÚSCULO ESQUELÉTICO</b>	<b>159</b>
1.1. Caracterización del modelo de estudio	150
1.2. Efectos de la sobreexpresión de LCPT I sobre el metabolismo de ácidos grasos	161
1.3. Efectos de la sobreexpresión de LCPT I sobre el metabolismo de glucosa estimulado por insulina	165
1.4. Efecto de los ácidos grasos y de la sobreexpresión de LCPT I en las vías de señalización de la insulina	168
1.5. Papel de la fosforilación en serinas de IRS-1 en la resistencia a la insulina inducida por ácidos grasos	170
1.6. La sobreexpresión de LCPT I M593S no ocasiona ninguna mejora respecto la sobreexpresión de LCPT I wt	171
1.7. Perspectivas futuras: efectos de la sobreexpresión de LCPT I en el estudio de la diabetes y obesidad	172
<b>2. EFECTO DE LA SOBREENPRESIÓN DE FAT/CD36 EN LA OXIDACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN CÉLULAS MUSCULARES L6E9</b>	<b>175</b>
2.1. Caracterización del modelo de estudio	176
2.2. Efecto de la sobreexpresión de FAT/CD36 en la oxidación de palmitato en células L6E9	177

<b>3. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE EL C75 Y LA CPT I EN CÉLULAS DE MÚSCULO ESQUELÉTICO</b>	<b>179</b>
3.1. El C75 inhibe la actividad CPT I células de músculo esquelético	180
3.2. El C75 inhibe la oxidación de palmitato en células L6E9	182
3.3. El C75 inhibe la CPT I en músculo <i>in vivo</i> a corto plazo	184
 <b>CONCLUSIONES</b>	 <b>189</b>
 <b>PUBLICACIONES</b>	

## **INTRODUCCIÓN**





## INTRODUCCIÓN

### 1. DIABETES

La diabetes mellitus es una enfermedad provocada por una desregulación en el metabolismo de los carbohidratos y de los ácidos grasos, ya sea debido a un fallo en la producción de insulina o a un fallo en su acción sobre sus tejidos diana. Esto conlleva a la presencia de niveles de glucosa elevados tanto en situaciones de ayuno como en estados postabsortivos si no se trata adecuadamente.

La diabetes mellitus ha alcanzado proporciones epidémicas y afecta a más de 170 millones de personas en todo el mundo. Estudios realizados en el año 2001 pronosticaban un crecimiento del 50% para el año 2010, con el mayor crecimiento en los países en vías de desarrollo de África, Asia y América del Sur<sup>1</sup>. En países más desarrollados la prevalencia de la diabetes ha alcanzado el 6%<sup>2</sup>, y de entre los adolescentes obesos caucásicos el 4% tienen diabetes y el 25% sufren intolerancia a la glucosa<sup>3</sup>.

La diabetes se caracteriza por una hiperglucemia en ayuno como consecuencia de la falta de insulina o de su correcta acción en el hígado y tejidos periféricos, y de niveles aumentados de glucagón. Además, los ácidos grasos del tejido adiposo son liberados anormalmente, promoviendo la estimulación de la cetogénesis hepática. Estos desordenes metabólicos conducen a los típicos síntomas de la diabetes: poliuria, polifagia y polidipsia. La diabetes se asocia también con neuropatías, nefrologías, retinopatías, enfermedades coronarias y muerte prematura. El resultado es una disminución sustancial de la calidad y la esperanza de vida. Todas estas complicaciones

---

<sup>1</sup> Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 2001; 414, 782-787

<sup>2</sup> King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2005: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 1998; 21, 1414-1431

<sup>3</sup> Sinha R, Fisch G, Teague B, et al. Prevalence of impaired glucose tolerance among children and adolescents with marked obesity. *N Engl J Med* 2001, 346, 802-810

asociadas son las responsables del gran impacto sanitario y socioeconómico que comporta esta enfermedad.

La diagnosis de la enfermedad se realiza en base a las recomendaciones de la organización mundial de la salud (OMS) de 1999<sup>4</sup>. Así, se considera que un individuo es diabético cuando sus niveles de glucosa en plasma en ayuno son superiores a 7 mM o cuando son superiores a 11,1 mM después de 2 h de haber ingerido un bolo de 75 g de glucosa. Del mismo modo, se considera que un individuo es intolerante a la glucosa (estado que precede a la diabetes) cuando sus niveles de glucosa están entre 7,8 y 11,1 mM después de la ingesta de un bolo de 75 g de glucosa.

Mantener una dieta sana y hacer ejercicio regularmente son dos aspectos muy importantes para la prevención y el tratamiento de la diabetes. Incluso manteniendo un estilo de vida sano, muchos pacientes necesitan intervención farmacológica, que puede consistir en una única o una combinación de las siguientes medicaciones orales: sulfonilureas (estimulan la secreción de insulina por la célula  $\beta$  pancreática), metformina (inhibe la producción hepática de glucosa) o tiazolidindionas (sensibilizan el músculo y el tejido adiposo a la insulina). Sin embargo, el 30-40% de los pacientes no están adecuadamente controlados con estas terapias y necesitan inyectarse insulina para normalizar sus niveles de glucosa, con el riesgo inherente de sufrir una hipoglucemia y sus fatales consecuencias.

La diabetes mellitus se conoce desde los tiempos de Aristóteles. En 1889 Oskar Minkowski observó que la orina de perros pancreatectomizados atraía a un número inusual de moscas. Intrigado, decidió probar la orina y se quedó sorprendido por su dulzura. Fue así como estableció por primera vez que el páncreas producía algo esencial para el control de la concentración de azúcar en sangre, el cual, cuando estaba ausente, causaba diabetes mellitus. Varias décadas después, en 1921, Frederick Banting identificó esta molécula pancreática activa como la insulina. De esta manera surgió el concepto de un eje insulina-glucosa como componente central de la homeostasis energética. De acuerdo con esto, la diabetes mellitus se ha tratado siempre pensando en que era un defecto del metabolismo de la glucosa. Sin embargo, hoy en día está claro que el metabolismo de la glucosa y el de los lípidos están íntimamente

---

<sup>4</sup> Stumvoll M, Goldstein BJ, Haeften TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* 2005, 365:1333-1346

interrelacionados. En este sentido, McGarry<sup>5</sup> postuló que si Minkowski se hubiera percatado del olor a acetona de la orina de los perros diabéticos, generada por el metabolismo lipídico, en vez del sabor dulce, probablemente hubiéramos avanzado en nuestro conocimiento sobre esta enfermedad más rápidamente.

### **1.1. DIABETES DE TIPO 1**

El 5-10% de los pacientes diabéticos caen dentro de la categoría de diabetes de tipo 1 o diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM). Estos pacientes son completamente dependientes de insulina exógena debido a una destrucción autoinmune de las células productoras de insulina (células  $\beta$ ) del páncreas. Este tipo de diabetes aparece antes de los 25 años de edad.

La diabetes de tipo 1 se diagnostica tras la aparición de unos síntomas claros durante varios días. La típica tríada de síntomas incluye una gran sed (polidipsia), mucha hambre (polifagia) y pérdida abundante de orina (poliuria). En ocasiones puede aparecer cetoacidosis diabética pudiendo entrar los pacientes en coma.

### **1.2. DIABETES DE TIPO 2**

La diabetes de tipo 2 o diabetes no dependiente de insulina (NIDDM) es mucho más común y afecta al 75-90% de los pacientes diabéticos. La diabetes de tipo 2 se caracteriza por una combinación de factores genéticos y ambientales que afectan a la capacidad del organismo para responder a las acciones de la insulina.

Los estados tempranos de la enfermedad se caracterizan por una conjunción de anormalidades metabólicas y hormonales como resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, hiperlipidemia, hipercolesterolemia, intolerancia a la glucosa e hipertensión. Estos síntomas se denominan en su conjunto a menudo como síndrome X<sup>6</sup>.

La enfermedad esta causada por dos factores: 1) la resistencia a la insulina, definida como la incapacidad de la hormona para suprimir la producción hepática de glucosa y para promover la captación de glucosa por los tejidos periféricos, y 2) una función disminuida de la célula  $\beta$  del páncreas. Así la enfermedad se caracteriza por una

---

<sup>5</sup> McGarry JD. What if Minkowski had been ageusic? An alternative angle of Diabetes. *Science* 1992, 258: 766-770

<sup>6</sup> Reaven GM. The role of insulin resistance and hyperinsulinemia in coronary heart disease. *Metabolism*. 1992, 41:16-19

disminución progresiva de la acción de la insulina, seguida de una incapacidad por parte de la célula  $\beta$  de compensar esta resistencia a las acciones de la hormona.

Cronológica y metabólicamente la enfermedad podría seguir este curso<sup>7</sup>: la resistencia a la insulina parece ser la lesión primaria, debida a factores genéticos, a la edad, estilo sedentario de vida o a cambios metabólicos producidos por la obesidad. Esta resistencia a la insulina causa un fallo en la captación de glucosa estimulada por insulina en músculo. Además, en tejido adiposo, la resistencia a los efectos antilipolíticos de la insulina causa una liberación aumentada de ácidos grasos. A su vez, estos ácidos grasos atenúan la capacidad de la insulina para inhibir la producción hepática de glucosa, llegando a una situación de hiperglucemia. Esta desregulación del metabolismo de lípidos y carbohidratos acelera la progresión de la resistencia a la insulina. Normalmente la célula  $\beta$  del páncreas compensa el estado de resistencia a la insulina incrementando la secreción de insulina, agravando aún más la resistencia a la insulina. Llegado un punto, la célula  $\beta$  pierde esta capacidad y deja de responder apropiadamente a las concentraciones de glucosa. Esto conduce a un deterioramiento de la homeostasis de la glucosa y a la aparición de la intolerancia a la glucosa. Por año, aproximadamente un 5-10% de los pacientes intolerantes a la glucosa progresan hacia diabetes, que continúan empeorando mientras la resistencia a la insulina incrementa, llegando a situaciones en las que requieren inyecciones de insulina para poder sobrevivir.

La diabetes de tipo 2, en contra de la de tipo 1, está fuertemente asociada a la obesidad<sup>8</sup>. Alrededor del 80% de los individuos con diabetes de tipo 2 son obesos, más concretamente con obesidad visceral central. Sin embargo, sólo el 10% de los individuos obesos son diabéticos. La diabetes de tipo 2 está relacionada además con la disminución de los depósitos de grasa, reflejada en los niveles elevados de ácidos grasos y triglicéridos circulantes, junto con una deposición excesiva de grasa en tejidos periféricos incluido el músculo<sup>9</sup>.

---

<sup>7</sup> Saltiel AR. New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell* 2001, 104:517-529

<sup>8</sup> Nadler ST, Store JP, Schueler KL, Tanimoto G, Yandell BS, Attie AD. The expression of adipogenic genes is decreased in obesity and diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000, 97:11371-11376

<sup>9</sup> Reaven GM. The fourth musketeer—from Alexandre Dumas to Claude Bernard. *Diabetologia*. 1995. 38:3-13

### 1.2.1. Formas monogénicas de diabetes de tipo 2

Una minoría de pacientes diabéticos de tipo 2 (2-5%) sufren una forma de diabetes que resulta de mutaciones en un único gen, que puede provocar una disfunción de la célula  $\beta$ , o menos frecuentemente, resistencia a la insulina. Las formas más comunes son la diabetes que aparece en edades jóvenes o MODY (*maturity onset diabetes of the young*) y la diabetes asociada a sordera heredada por vía materna o MIDD (*maternally inherited diabetes and deafness*).

La primera se caracteriza por una aparición temprana, normalmente antes de los 25 años y frecuentemente en adolescentes o incluso niños, y por una herencia autosómica dominante<sup>10</sup>. Se han descrito mutaciones en cinco genes diferentes en base a los cuales se han clasificado las diferentes clases de MODY: HNF-4 $\alpha$  (MODY 1), glucoquinasa (MODY 2), HNF-1 $\alpha$  en el cromosoma 12q (MODY 3), IPF-1 o *insulin promoter factor-1* (MODY 4) y HNF-1 $\alpha$  en el cromosoma 17q (MODY 5).

La diabetes heredada por vía materna o MIDD se caracteriza por una herencia de mutaciones en el genoma mitocondrial. Estas mutaciones producen una disminución de la capacidad de la fosforilación oxidativa, provocando una disminución en la relación ATP/ADP y por lo tanto una menor capacidad de secreción de insulina. Esta forma de diabetes también aparece en edades jóvenes y puede progresar hasta la necesidad de inyectarse insulina debido a una pérdida progresiva de células  $\beta$ <sup>11</sup>.

## 2. RESISTENCIA A LA INSULINA

Como se ha descrito anteriormente, la resistencia a la insulina se define como el fallo del organismo a responder normalmente a la insulina. En situaciones normales, tras una ingesta los niveles de glucosa en plasma suben. Esta subida es detectada por la célula  $\beta$  del páncreas que procede a la secreción de insulina para mantener los niveles de glucosa constantes. La insulina secretada por el páncreas ejerce las siguientes funciones en los tejidos periféricos: 1) estimula la captación de glucosa por parte del músculo, 2) inhibe la producción hepática de glucosa y 3) inhibe la hidrólisis de las grasas del tejido

---

<sup>10</sup> Frayling T. Maturity-onset diabetes of the young: a monogenic model of diabetes. In type 2 diabetes: prediction and prevention. *Hitman G.* Ed. John Wiley & Sons. 107-126, 1999

<sup>11</sup> Permutt MA, Hattersley AT. Searching for type 2 diabetes genes in the post-genome era. *Trends in endocrinology and metabolism.* 2000, 11:383-393

adiposo y estimula la captación de glucosa en el mismo tejido. Todo ello conlleva una bajada de los niveles de glucosa en plasma. La célula  $\beta$  del páncreas tiene la capacidad de adaptarse a cambios en la sensibilidad a la insulina en el resto del organismo. Es decir, tras una pequeña pérdida de sensibilidad a la insulina, la célula  $\beta$  secretará más insulina y viceversa. Todo esto se pierde cuando aparece la resistencia a la insulina.

La resistencia a la insulina es un estado comúnmente asociado a la obesidad. Estudios realizados tanto en animales como humanos demuestran que la ganancia o pérdida de peso se correlaciona respectivamente con una peor o mejor sensibilidad a la insulina<sup>12</sup>. Se han propuesto varios factores que podrían relacionar la obesidad con la resistencia a la insulina. Entre los candidatos están los ácidos grasos libres, el TNF- $\alpha$ , la leptina y la angiotensina, todos ellos secretados por el tejido adiposo.

La resistencia a la insulina está también ligada a la edad, a un estilo sedentario de vida o incluso a una predisposición genética, y es la responsable en gran medida de la aparición de la diabetes de tipo 2. Esta conclusión se basa en: 1) estudios que demuestran la presencia de resistencia a la insulina en pacientes con diabetes de tipo 2<sup>13</sup>, 2) la presencia de resistencia a la insulina en la descendencia no diabética de pacientes con diabetes de tipo 2<sup>14</sup>, 3) estudios que demuestran la utilidad de la resistencia a la insulina como un marcador para predecir una futura diabetes de tipo 2<sup>13</sup>, y 4) el uso de agentes sensibilizadores a la insulina para la prevención de la diabetes<sup>15</sup>.

Aunque la definición de resistencia a la insulina había versado siempre en términos del metabolismo de la glucosa, en la última década se ha visto un cambio desde el punto de vista “glucocéntrico” tradicional hacia un nuevo punto de vista más “lipocéntrico”. Esta hipótesis sostiene que anomalías en el metabolismo de ácidos grasos pueden resultar en una acumulación de lípidos en músculo, hígado y célula  $\beta$ <sup>16</sup>.

---

<sup>12</sup> Freidenberg GR, Reichart D, Olefsky JM, Henry RR. Reversibility of defective adipocyte insulin receptor kinase activity in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Effect of weight loss. *J Clin Invest* 1988, 82:1398-1406

<sup>13</sup> Lillioja S, Mott DM, Spraul M, Ferraro R, Foley JE, Ravussin E, Knowler WC, Bennett PH, Bogardus C. Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin dependent diabetes mellitus. Prospective studies of Pima Indians. *N Engl J Med*. 1993, 329:1988-1992

<sup>14</sup> Warram JH, Martín BC, Krolewski AS, Soeldner JS, Kahn CR. Slow glucose removal rate and hyperinsulinemia precede the development of type II diabetes in the offspring of diabetic patients. *Ann Intern Med*. 1990, 113:909-915

<sup>15</sup> Buchanan TA, Xiang AH, Peters RK, Kjos SL, Marroquin A, Goico J, Ochoa C, Tan S, Berkowitz K, Hodis HN, Azen SP. Preservation of pancreatic beta-cell function and prevention of type 2 diabetes by pharmacological treatment of insulin resistance in high-risk Hispanic women. *Diabetes*. 2002, 51:2796-2803

<sup>16</sup> McGarry JD. Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002, 51:7-18

Así, se ha propuesto que acumulación la ectópica de lípidos está involucrada en la aparición de la resistencia a la insulina en músculo, hígado y célula  $\beta$ . Esta teoría se ha llamado como la teoría de la lipotoxicidad<sup>17</sup>. La acumulación de lípidos en los miocitos y los hepatocitos está fuertemente correlacionada con la resistencia a la insulina en diabéticos<sup>18</sup>, parientes no diabéticos de pacientes de diabetes de tipo 2<sup>19</sup>, individuos con intolerancia a la glucosa y individuos obesos. Por lo tanto parece que la desregulación del metabolismo de los lípidos juega un papel fundamental en la aparición de la resistencia a la insulina.

## **2.1. RESISTENCIA A LA INSULINA EN MÚSCULO**

El músculo en reposo es el responsable del 20% del metabolismo de glucosa, pero bajo condiciones de estimulación por insulina es el responsable del 80% de la captación de glucosa y más de un 80% de esta glucosa se acumula en forma de glucógeno. Por lo tanto, el músculo es el mayor contribuidor a la resistencia a la insulina en la diabetes de tipo 2. En pacientes diabéticos, la glucosa captada en respuesta a insulina es un 30-40% menor que en individuos no diabéticos, y un 90% de esta disminución es debida a la menor captación por tejidos periféricos, y entre ellos principalmente el músculo. Todo esto confiere al músculo esquelético una vital importancia en el desarrollo de la resistencia a la insulina así como una posible diana farmacológica para el tratamiento de la diabetes de tipo 2.

### **2.1.1. Transducción de la señal de la insulina en músculo esquelético**

Los efectos de la insulina en el transporte de glucosa y otros eventos metabólicos en músculo esquelético están mediados por una cascada de señales intracelulares (fig.1). La insulina inicia su acción uniéndose a su receptor (IR). El receptor de la insulina pertenece a una familia de receptores de factores de crecimiento, todos ellos con una actividad tirosina quinasa endógena. El receptor de la insulina es una glucoproteína

---

<sup>17</sup> Unger RH, Orci L. Lipotoxic diseases of nonadipose tissues in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2000, 24(suppl. 4):S28-S32

<sup>18</sup> Boden G, Shulman GI. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *Eur J Clin Invest*. 2002, 32 (suppl 3):14-23

<sup>19</sup> Jacob S, Mascham J, Rett K, Bretchtel K, Volk A, Renn W, Maerker E, Matthaei S, Schick F, Clausen CD, Haring HU. Association of increased intramyocellular lipid content with insulin resistance in lean nondiabetic offspring of type 2 diabetic subjects. *Diabetes* 1999, 48:1113-1119

heterotetramérica de membrana que se compone de dos subunidades  $\alpha$  y dos subunidades  $\beta$ . La insulina se une a la subunidad  $\alpha$  extracelular y induce un cambio conformacional que provoca un acercamiento de las dos subunidades  $\alpha$ . Esto conduce a una rápida autofosforilación del receptor en diversos residuos de tirosina. La fosforilación de la tirosina 960 (Tyr<sup>960</sup>) crea un sitio de reconocimiento para el dominio de unión a fosfotirosinas de los sustratos del receptor de la insulina o IRSs<sup>20</sup>.

Como mínimo se han identificado 12 IRSs: IRS-1, IRS-2, IRS-3, IRS-4, IRS-5, IRS-6, Gab-1, tres isoformas de Shc, p62<sup>dok</sup> y APS (proteína adaptadora que contiene un dominio PH y SH2)<sup>21</sup>. IRS-1 fue el primero en descubrirse y es el encargado de transmitir la señal de la insulina hacia el transporte de glucosa, síntesis de proteínas, glucógeno y lípidos, mitogénesis y expresión de genes. Además, el IRS-1 contiene entre 20-22 sitios de fosforilación en tirosinas y más de 30 lugares de fosforilación en serina o treonina<sup>22</sup>.

Los IRSs unidos al receptor de la insulina pueden ser fosforilados por éste en diversas tirosinas, creando a su vez nuevos lugares de interacción para otras proteínas. Una de estas proteínas es la PI3K. Esta proteína es una quinasa lipídica heterodimérica con una gran variedad de funciones celulares. La PI3K está compuesta por una subunidad reguladora (p85) que contiene dos dominios SH2 responsables de la unión al IRS y una subunidad catalítica (p110). Existen como mínimo ocho isoformas de la p85 codificadas por tres genes distintos. La proteína activa cataliza la fosforilación de los fosfoinositoles para formar fosfoinositol-3-fosfatos, especialmente fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato a partir de fosfatidilinositol-4,5-difosfato<sup>23</sup>. Esta molécula se comporta como un segundo mensajero que puede activar a diversas proteínas, como la PDK o

---

<sup>20</sup> White MF, Livingston JN, Backer JM, Lauris V, Dull TJ, Ullrich A, Kahn CR. Mutation of the insulin receptor at tyrosine 960 inhibits signal transmission but does not affect its tyrosine kinase activity. *Cell* 1988, 54:641-649

<sup>21</sup> White MF. The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol Cell Biochem* 1998, 182:3-11

<sup>22</sup> Sun XJ, Crimmins DL, Myers MG, Miralpeix M, White MF. Pleiotropic insulin signals are engaged by multisite phosphorylation of IRS-1. *Mol Cell Biol* 1993, 13:7418-7428

<sup>23</sup> Van der Kaay J, Batty IH, Cross DAE, Watt PW, Downes CP. A novel, rapid, and highly sensitive mass assay for phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PtdIns(3,4,5)P3) and its application to measure insulin-stimulated PtdIns(3,4,5)P3 production in rat skeletal muscle in vivo. *J Biol Chem* 1997, 272:5477-5481



algunas isoformas de PKC. La PDK es responsable de la activación de la Akt/PKB por fosforilación en las Ser473 y la Thr308<sup>24</sup>.

Existen tres isoformas de Akt/PKB: Akt1, Akt2 y Akt3, todas ellas expresadas ubicuamente. Akt1 y Akt2 están involucradas en la transducción de la señal de la insulina en el tejido adiposo y músculo. La Akt fosforilada es activa y es la encargada de dirigir la señal de la insulina hacia el transporte de glucosa y la síntesis de glucógeno.

El transporte basal de glucosa en la célula muscular depende del transportador GLUT 1, y en respuesta a insulina el transporte de glucosa aumenta por la estimulación de la translocación del transportador de glucosa de alta afinidad GLUT 4 desde compartimentos intracelulares a la membrana plasmática<sup>25</sup>. La estimulación de la síntesis de glucógeno es llevada a cabo por la fosforilación e inactivación de la GSK-3 por parte de la Akt/PKB<sup>26</sup>. Esta inhibición disminuye el nivel de fosforilación de la glucógeno sintasa (GS), aumentando su actividad. Por otro lado, la insulina es capaz también de activar la proteína fosfatasa 1 o PP1, que desfosforilará la glucógeno sintasa aumentando su actividad<sup>27</sup>.

Además de la vía de la PI3K, el transporte de glucosa se estimula también por otra vía secundaria. Esta vía parece involucrar la fosforilación en tirosinas del protooncogen Cbl<sup>28</sup>. En tejidos sensibles a la insulina, esta proteína se encuentra unida a la proteína adaptadora CAP, formando un complejo Cbl-CAP responsable de la estimulación de la translocación de GLUT 4 a la membrana.

---

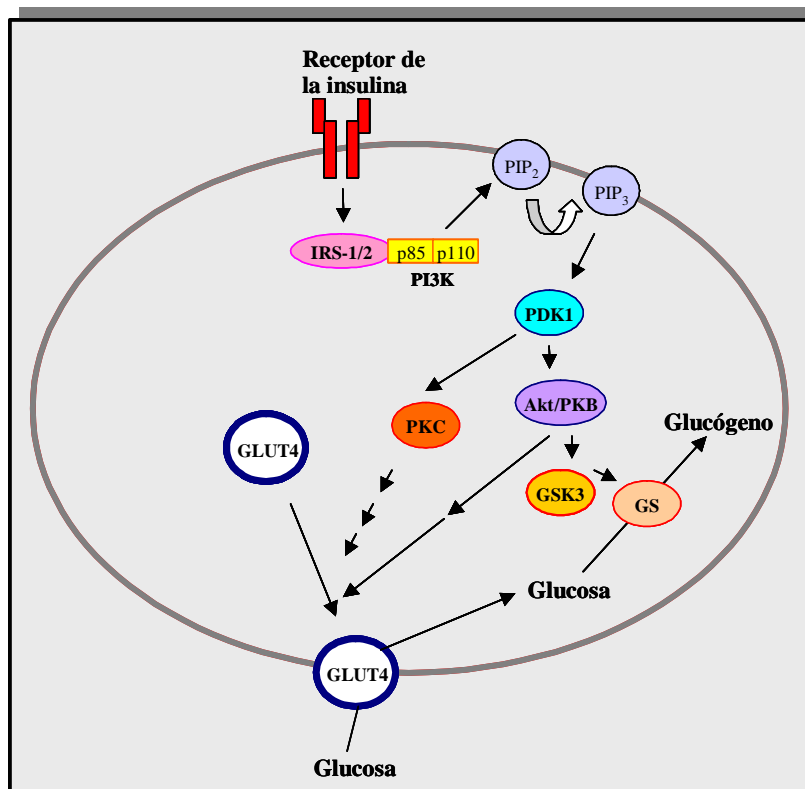
<sup>24</sup> Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings BA. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J* 1996, 15:6541-6551

<sup>25</sup> Tordjman KM, Leingang KA, James DE, Mueckler MM. Differential regulation of two distinct glucose transporter species expressed in 3T3-L1 adipocytes: effect of chronic insulin and tolbutamide treatment. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86:7761-7765

<sup>26</sup> Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovic M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 1995, 378:785-789

<sup>27</sup> Brady MJ, Nairn AC, Saltiel AR. The regulation of glycogen synthase by protein phosphatase 1 in 3T3-L1 adipocytes. Evidence for a potential role for DARPP-32 in insulin action. *J Biol Chem* 1997, 272:29668-29703

<sup>28</sup> Ribon V, Saltiel AR. Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the protooncogen product of c-Cbl in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem J* 1997, 324:839-845



**Figura 1. Esquema de la vía de transducción de señal de la insulina en músculo.** La insulina se une a su receptor que se autofosforila y une IRSs. Estas proteínas son puntos de unión a su vez de otras proteínas como la PI3K, que cataliza la formación de PIP<sub>3</sub>. Este segundo mensajero es capaz de activar la PDK y esta a su vez fosforila y activa a la Akt/PKB y PKC. La fosforilación de esta proteína es necesaria para la activación del transporte de glucosa y la síntesis de glucógeno.

### 2.1.2. Mecanismos implicados en la inhibición de la transducción de señal de la insulina

El control de la señalización de la insulina se consigue por la autorregulación llevada a cabo por proteínas que inhiben los elementos de la cascada (desensibilización homóloga). Alternativamente, también pueden inhibir la señalización de la insulina señales de vías aparentemente no relacionadas (desensibilización heteróloga). El receptor de la insulina y los IRSs están sujetos a este complejo control.

Un posible mecanismo de desensibilización llevado a cabo por las fosforilaciones en Ser/Thr de los IRSs, desacoplando estas moléculas de sus efectores.

Esta fosforilación puede inducir la disociación de los IRSs del receptor de la insulina<sup>29</sup>, dificultar o disminuir su fosforilación en tirosinas<sup>30</sup>, separarlos de los complejos intracelulares que los mantienen en la proximidad del receptor de la insulina<sup>31</sup> o inducir su degradación<sup>32</sup>. Todas estas funciones son llevadas a cabo por Ser/Thr quinasas. Un candidato potencial es la proteína mTOR, que potencia la fosforilación de los residuos de serina en el extremo carboxi terminal de IRS-1. Esta fosforilación inhibe la fosforilación en tirosina estimulada por insulina y la capacidad de IRS-1 de unir la PI3K<sup>33</sup>. Otro candidato es la PKC  $\zeta$ , que fosforila a IRS-1 en la Ser318, inhibiendo su fosforilación en tirosinas<sup>34</sup>. Otra quinasa involucrada en este proceso es la IKK $\beta$ . Esta quinasa es parte del complejo IKK que fosforila al inhibidor del NF- $\kappa$ B, el I $\kappa$ B. Esta fosforilación provoca la degradación del I $\kappa$ B, permitiendo la translocación del NF- $\kappa$ B al núcleo. IKK $\beta$  es un efector de la PKC  $\zeta$  y además puede fosforilar directamente a IRS-1 en la Ser312<sup>35</sup>. Por último, otra quinasa que participa en la desensibilización de la señal de la insulina es la JNK (*c-Jun-N-terminal kinase*), que se activa por insulina y fosforila a IRS-1 en la Ser307<sup>36</sup>.

Bajo ciertas condiciones patológicas puede darse una desregulación de todo este proceso de control de la señal de la insulina, siendo esto un factor importante en la aparición de la resistencia a la insulina. Los mecanismos que pueden explicar esta

---

<sup>29</sup> Liu YF, Paz K, Herchkovitz A, Alt A, Tennenbaum T, Sampson SR, Ohba M, Kuroki T, LeRoith D, Zick Y. Insulin stimulates PKCzeta -mediated phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). A self-attenuated mechanism to negatively regulate the function of IRS proteins. *J Biol Chem* 2001, 276:14459-14465

<sup>30</sup> Mothe I, VanObberghen E. Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on multiple serine residues, 612, 632, 662, and 731, modulates insulin action. *J Biol Chem* 1996, 271:11222-11227

<sup>31</sup> Tirosh A, Potashnik R, Bashan N, Rudich A. Oxidative stress disrupts insulin-induced cellular redistribution of insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol 3-kinase in 3T3-L1 adipocytes. A putative cellular mechanism for impaired protein kinase B activation and GLUT4 translocation. *J Biol Chem* 1999, 274:10595-10602

<sup>32</sup> Pederson TM, Kramer DL, Rondinone CM. Serine/threonine phosphorylation of IRS-1 triggers its degradation: possible regulation by tyrosine phosphorylation. *Diabetes* 2001, 50:24-31

<sup>33</sup> Li J, DeFea, Roth RA. Modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation by an Akt/phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Biol Chem* 1999, 274:9351-9356

<sup>34</sup> Moeschel K, Beck A, Weigert C, Lammers R, Kalbacher H, Voelter W, Scheicher ED, Haring HU, Lehmann R. Protein kinase C-zeta-induced phosphorylation of Ser318 in insulin receptor substrate-1 (IRS-1) attenuates the interaction with the insulin receptor and the tyrosine phosphorylation of IRS-1. *J Biol Chem* 2004, 279:25157-24163

<sup>35</sup> Gao Z, Hwang G, Bataille F, Lefevre M, York D, Quon M, Ye J. Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex. *J Biol Chem* 2002, 277:48115-48121

<sup>36</sup> Lee YH, Giraud J, Davis RJ, White MF. c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. *J Biol Chem* 2003, 278:2896-2902

desregulación incluyen al TNF $\alpha$  (*tumor necrosis factor  $\alpha$* ), los ácidos grasos y el estrés celular. Estas tres posibilidades versan a través de la activación de Ser/Thr quinasas, posiblemente las mismas que están involucradas en el control fisiológico de la señalización de la insulina. Así por ejemplo, la citoquina TNF $\alpha$  es capaz de inducir la activación de la producción de ceramidas, que pueden activar la PKC  $\zeta$  y con ello el IKK $\beta$ . El TNF $\alpha$  puede activar también a JNK, que fosforila IRS-1 en la Ser307, desacoplándolo del receptor de la insulina. El TNF $\alpha$  es producido por los adipocitos, y su expresión se encuentra aumentada a nivel de mRNA y proteína en la mayoría de los modelos animales de obesidad y en humanos obesos<sup>37</sup>.

Los ácidos grasos pueden activar a la PKC  $\theta$  (tal y como se detallará más adelante) en músculo esquelético, un proceso que conlleva la fosforilación de la Ser307 del IRS-1, y la PKC  $\alpha$ , que utiliza miembros de la familia de la MAPK para fosforilar a IRS-1 en la Ser612. Se ha propuesto que la fosforilación de esta serina en el IRS-1 inhibe la señalización de la insulina, sugiriendo un posible mecanismo de resistencia a la insulina<sup>38</sup>. Además de las PKCs, los ácidos grasos pueden activar también la quinasa IKK $\beta$  a través de la activación de PKC  $\theta$  y PKC  $\zeta$ , atenuando la señalización de la insulina. La inhibición de esta quinasa por salicilato a altas dosis revierte la obesidad y la resistencia a la insulina en modelos animales y mejora el metabolismo de la glucosa en pacientes diabéticos<sup>39</sup>. Además, esta quinasa puede ser también activada por citoquinas proinflamatorias, como se detallará más adelante.

Las proteína-tirosina fosfatasas (PTPs) se han implicado también en la regulación de la cascada de señalización de la insulina. Así, ratones *knock-out* para PTP-1B tienen una fosforilación en tirosinas de IRS-1 aumentada en músculo esquelético, así como una mayor sensibilidad a la insulina<sup>40</sup>. En base a estos resultados, la inhibición de PTP-1B sería un buen tratamiento para la resistencia a la insulina. Sin embargo, en músculo esquelético de diabéticos de tipo 2 se vió una expresión reducida

---

<sup>37</sup> Hotamisligil GS, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor  $\alpha$ : a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes* 1994, 35:777-784

<sup>38</sup> DeFea K, Roth RA. Protein kinase C modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation requires serine 612. *Biochemistry* 1997, 36:12939-12947

<sup>39</sup> Hundal RS, Petersen KF, Mayerson AB, Randhawa PS, Inzucchi S, Sohelson SE, Shulman GI. Mechanism by which high-dose aspirin improves glucose metabolism in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 2002, 109:1321-1326

<sup>40</sup> Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E, Cormlish W, Collins S, Loy AL, Normandin D, Cheng A, Himms-Hagen J, Chan CC. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science* 1999, 283:1544-1548

de PTP-1B<sup>41</sup> y en individuos obesos no diabéticos, la expresión y la actividad de PTP-1B estaban aumentadas<sup>42</sup>, implicando una regulación diferente en diabetes de tipo 2 y obesidad.

En resumen, bajo ciertas circunstancias, fisiológicas o patológicas, ya sea por una fosforilación desregulada en residuos de serina o treonina del IRS-1 que interfieren con la fosforilación en tirosinas, o por una desregulada desfosforilación de estos residuos de tirosina, la cascada de señalización de la insulina puede verse afectada y no transducir la señal adecuadamente, conduciendo a un estado de resistencia a la insulina.

## 2.2. RESISTENCIA A LA INSULINA INDUCIDA POR ÁCIDOS GRASOS

La primera evidencia de la participación de los ácidos grasos en la menor captación de glucosa en músculo fue propuesta en 1963 por Randle y colaboradores<sup>43</sup>. Propusieron una conexión entre la resistencia a la insulina en músculo y concentraciones elevadas de ácidos grasos. Demostraron que los ácidos grasos competían con la glucosa como sustrato energético en músculo y tejido adiposo, y describieron esta relación como el ciclo de la glucosa-ácidos grasos. De acuerdo con este ciclo, una oxidación incrementada de ácidos grasos causaría un incremento en los niveles mitocondriales de acetil-CoA/CoA y NADH/NAD<sup>+</sup>, con la subsiguiente inactivación de la piruvato deshidrogenasa. A su vez, esto induciría un aumento de los niveles celulares de citrato, conduciendo a la inactivación de la fosfofructoquinasa y a una acumulación de glucosa-6-fosfato. Como la glucosa-6-fosfato inhibe la hexoquinasa, esto resultaría en una acumulación de glucosa y una inhibición de su transporte a través de la membrana.

Pero este modelo no concuerda con los estudios realizados por Shulman y colaboradores<sup>44</sup> que vieron que en individuos diabéticos la síntesis de glucógeno estaba

---

<sup>41</sup> Worm D, Vinten J, Staehr P, Henriksen JE, Handberg A, Beck-Nielsen H. Altered basal and insulin-stimulated phosphotyrosine phosphatase (PTPase) activity in skeletal muscle from NIDDM patients compared with control subjects. *Diabetologia* 1996, 39:1208-1214

<sup>42</sup> Ahmad F, Azevedo JL, Cortright R, Dohm GI, Golsdtein BJ. Alterations in skeletal muscle protein-tyrosine phosphatase activity and expression in insulin-resistant human obesity and diabetes. *J Clin Invest* 1997, 100:449-458

<sup>43</sup> Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose fatty-acid cycle: its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1963, 1:785-789

<sup>44</sup> Shulman GI, Rothman DL, Jue T, Stein P, DeFronzo RA, Shulman RG. Quantitation of muscle glycogen synthesis in normal subjects and subjects with non-insulin-dependent diabetes mellitus by <sup>13</sup>C nuclear magnetic spectroscopy. *N Engl J Med* 1990, 322:223-228

un 50% disminuida respecto a individuos control. Para elucidar el mecanismo por el cual esto ocurría, hicieron estudios usando técnicas de resonancia magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  y  $^{31}\text{P}$  para seguir las concentraciones intracelulares de glucosa-6-fosfato (precursor de la síntesis de glucógeno). La glucosa-6-fosfato es un intermediario entre el transporte de glucosa y su subsiguiente fosforilación por la hexoquinasa y la síntesis de glucógeno. El incremento en glucosa-6-fosfato tras la estimulación por insulina está reducido en pacientes diabéticos, sugiriendo que el paso que controla la deposición de glucosa en músculo es el transporte de glucosa y no la síntesis de glucógeno mediada por la glucógeno sintasa<sup>45</sup>. Usando la misma técnica para medir los niveles de glucosa en músculo se observó que los niveles de glucosa en diabéticos eran mucho menores que los que tendrían que ser si la hexoquinasa fuera el paso limitante. Por lo tanto, el transporte de glucosa en músculo es el paso limitante que controla la síntesis de glucógeno, y este paso está disminuido en pacientes diabéticos.

Posteriormente, estudios realizados a cabo por Boden y colaboradores<sup>46</sup> demostraron que infusiones de lípidos diseñadas para elevar los niveles de ácidos grasos en plasma tanto en humanos como roedores provocan una reducción del metabolismo de glucosa estimulado por insulina. Además, la pérdida de sensibilidad a la insulina sólo se daba después de varias horas tras el aumento de los ácidos grasos en plasma, de acuerdo con la idea que la acumulación de ácidos grasos en músculo e hígado es la responsable de esta resistencia a la insulina.

De este modo, los ácidos grasos deben provocar la resistencia a la insulina en músculo afectando directamente al transporte de glucosa, bien con efectos directos sobre la actividad de GLUT 4 o alterando la translocación estimulada por insulina de GLUT 4 desde compartimentos intracelulares hacia la membrana plasmática.

Del mismo modo que una infusión de lípidos conlleva a una pérdida de sensibilidad a la insulina en músculo, una acumulación de lípidos en músculo provoca el mismo efecto. Estudios realizados con ratas alimentadas con una dieta rica en grasa demostraron una acumulación de triglicéridos en el músculo así como una pérdida de

---

<sup>45</sup> Rothman DL, Shulman RG, Shulman GI.  $^{31}\text{P}$  nuclear magnetic resonance measurements of muscle glucose-6-phosphate. Evidence for reduced insulin-dependent muscle glucose transport or phosphorylation activity in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1992, 89:1069-1075

<sup>46</sup> Boden G, Jadali F, White J, Liang Y, Mozzoli M, Chen X. Effects of fat on insulin-stimulated carbohydrate metabolism in normal men. *J Clin Invest* 1991, 88:960-966

sensibilidad a la insulina<sup>47</sup>. Asimismo, en humanos también se ha demostrado una correlación inversa entre acumulación de lípidos en el músculo y sensibilidad a la insulina<sup>48</sup>.

Otra evidencia clara del importante papel que desempeña la acumulación de lípidos en músculo en la aparición de la resistencia a la insulina proviene de los estudios realizados con ratones lipodistróficos. Estos ratones no tienen tejido adiposo y acumulan la grasa en los tejidos periféricos. Esto hace que estos ratones tengan dos veces más lípidos en hígado y músculo y sean profundamente resistentes a la insulina<sup>49</sup>. Cuando a estos ratones se les trasplanta tejido adiposo normal los lípidos intracelulares y la sensibilidad a la insulina se normalizan. Este mecanismo es análogo al que tienen las tiazolidindionas como agentes antidiabéticos. Estos compuestos son activadores del PPAR $\gamma$  en el tejido adiposo, conduciendo a un incremento en la diferenciación de los adipocitos así como a una redistribución de los lípidos desde el músculo y el hígado al tejido adiposo, mejorando la sensibilidad a la insulina.

Por lo tanto parece clara la implicación de los lípidos intramiocelulares (aquellos que se acumulan dentro del músculo) en la resistencia a la insulina. Esta implicación se ve aún más apoyada por el hecho de que esta asociación entre lípidos intramiocelulares y resistencia a la insulina se da incluso en ausencia de concentraciones elevadas de ácidos grasos en plasma.

### **2.2.1. Especies lipídicas involucradas en la resistencia a la insulina en músculo**

Debido a su naturaleza química, parece poco probable que los triglicéridos puedan interferir por sí mismos en la acción de la insulina en músculo. Un escenario más probable es que los triglicéridos actúen como un marcador subrogado a otra especie derivada de lípidos, como los aciles-CoA de cadena larga (LCACoA) o otros compuestos derivados de ellos, como el diacilglicerol (DAG) y las ceramidas.

Los aciles-CoA de cadena larga son las formas intracelulares activadas de los ácidos grasos, producidos por la acción de las aciles-CoA sintetasas (ACS). Estas

---

<sup>47</sup> Kraegen EW, Clark PW, Jenkins AB, Daley EA, Chisholm DJ, Storlien LH. Development of muscle insulin resistance after liver insulin resistance in high-fat-fed rats. *Diabetes* 1991, 40:1397-1403

<sup>48</sup> Pan DA, Lillioja S, Kriketos AD. Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action. *Diabetes* 1997, 46:983-988

<sup>49</sup> Kim JK, Cavrilova O, Chen Y, Reitman ML, Shulman GI. Mechanism of insulin resistance in A-ZIP/F-1 fatless mice. *J Biol Chem* 2000, 275:8456-8460

especies se encuentran aumentadas en animales resistentes a la insulina. La inhibición prolongada del enzima responsable del control de la oxidación de los aciles-CoA de cadena larga, la carnitina palmitoiltransferasa I (CPT I), por etomoxir, en un protocolo diseñado para incrementar los niveles de lípidos intramusculares en ratas, induce resistencia a la insulina<sup>50</sup>. Además, alimentando ratas con una dieta rica en grasa, los LCACoA aumentan en músculo y esto se correlaciona con una pérdida de sensibilidad a la insulina<sup>51</sup>.

Los aciles-CoA de cadena larga son moléculas señalizadoras reconocidas que pueden afectar a una gran variedad de procesos celulares y pueden influir en la acción de la insulina en músculo a través de varios mecanismos. Así, pueden inhibir la hexoquinasa en homogenados de soleus de rata o humano *in vitro*<sup>52</sup>, o pueden actuar a través de un mecanismo que involucra la disrupción de la cascada de señal de la insulina que conduce normalmente a la translocación de GLUT 4 a la membrana plasmática, a través de la activación de PKCs, ya sea directamente o a través del diacilglicerol (DAG).

El DAG es un intermediario del metabolismo de los triglicéridos y fosfolípidos. Puede sintetizarse *de novo* a partir de la esterificación de un acil-CoA de cadena larga y glicerol-3-fosfato o mediante la hidrólisis de fosfolípidos, principalmente fosfatidilinositol-3,4-difosfato y fosfatidilcolina, mediante la acción de las fosfolipasas C y D respectivamente. Se ha demostrado que el DAG se acumula en músculo de ratas sometidas a una dieta grasa<sup>53</sup> y en ratas Zucker<sup>54</sup>, así como en células de músculo

---

<sup>50</sup> Dobbins RL, Szczepaniak LS, Bentley B, Esser V, Myhill H, McGarry JD. Prolonged inhibition of muscle carnitine palmitoyltransferase-1 promotes intramyocellular lipid accumulation and insulin resistance in rats. *Diabetes* 2001, 50:123-130

<sup>51</sup> Ye JM, Doyl PJ, Iglesias MA, Watson DG, Cooney GJ, Kraegen EW. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- $\alpha$  activation lowers muscle lipids and improves insulin sensitivity in high-fat-fed rats. *Diabetes* 2001, 50:411-417

<sup>52</sup> Thompson AL, Cooney GJ. Acyl-CoA inhibition of hexokinase in rat and human skeletal muscle is a potential mechanism of lipid-induced insulin resistance. *Diabetes* 2000, 49:1761-1765

<sup>53</sup> Oakes ND, Kennedy CJ, Jenkins AB, Laybutt DR, Chisholm DJ, Kraegen EW. A new antidiabetic agent, BRL 49653, reduces lipid availability and improves insulin action and glucoregulation in the rat. *Diabetes* 1994, 43:1203-1210

<sup>54</sup> Turinsky J, O'Sullivan DM, Bayly BP. 1,2-diacylglycerol and ceramide levels in insulin-resistant tissues of the rat in vivo. *J Biol Chem* 1990, 265:16880-16885



tratadas con palmitato<sup>55</sup>. El DAG es un segundo mensajero importante involucrado en la señalización intracelular y ejerce sus acciones nocivas en la señalización de la insulina a través de la activación de PKCs, más concretamente a través de la PKC  $\theta$ <sup>56</sup>. La importancia de esta PKC se ha confirmado en ratas infundidas con lípidos, donde se ha encontrado un incremento de 4 veces en la actividad PKC  $\theta$ <sup>57</sup>. Además, se ha demostrado que ratones transgénicos con una inactivación de la PKC  $\theta$  están protegidos contra la resistencia a la insulina inducida por lípidos en músculo esquelético<sup>58</sup>.

Todo esto ha llevado a una atractiva hipótesis que sostiene que los niveles elevados de aciles-CoA de cadena larga generan un incremento en los niveles de DAG el cual es responsable de la activación de una serina quinasa (probablemente la PKC  $\theta$ ). Esta serina quinasa sería la responsable de la fosforilación en serinas del IRS-1 interfiriendo con su capacidad para reclutar y activar a la PI3K. El efecto neto es una pérdida del estímulo para la traslocación de GLUT 4 a la membrana plasmática y con ello una menor captación de glucosa en respuesta a insulina.

Además de los aciles-CoA de cadena larga y el DAG, otra especie relacionada con la resistencia a la insulina en músculo es la ceramida. La ceramida es un derivado de la esfingomielina, un fosfolípido componente de las membranas, y puede ser generada por acción de la esfingomielinasa o bien a través de la síntesis *de novo* a partir de palmitoil-CoA. La ceramida es un segundo mensajero y como tal puede modular la actividad de quinasas, fosfatasa y factores de transcripción a través de los cuales juega un papel importante en el control de la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis. Pero la ceramida también ha sido implicada en la resistencia a la insulina debido a diversas evidencias: los niveles intracelulares de ceramida están aumentados en músculo de ratas Zucker y en músculo de rata hecho resistente a la insulina por

---

<sup>55</sup> Montell E, Turini M, Marotta M, Roberts M, Noé V, Ciudad CJ, Macé K, Gómez-Foix AM. DAG accumulation from saturated fatty acids desensitizes insulin stimulation of glucose uptake in muscle cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2001, 280:E229-E237

<sup>56</sup> Schmitz-Peiffer C, Browne CL, Oakes ND, Kraegen EW, Biden TJ. Alterations in the expression and cellular localization of protein kinase C isozymes epsilon and theta are associated with insulin resistance in skeletal muscle of the high-fat-fed rat. *Diabetes* 1997, 46:169-178

<sup>57</sup> Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, Bell K, Barucci N, Lee D, Goodyear LJ, Kraegen EW, White MF, Shulman GI. Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase  $\theta$  and alterations in the insulin signalling cascade. *Diabetes* 1999, 48:1270-1274

<sup>58</sup> Kim JK, Fillmore JJ, Sunshine MJ, Albrecht B, Higashimori T, Kim DW, Liu ZX, Soos TJ, Cline GW, O'Brien WR, Littman DR, Shulman GI. PKC-theta knockout mice are protected from fat-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 2004, 114:823-827

denervación<sup>54</sup>. La ceramida reduce la fosforilación estimulada por insulina de IRS-1 y media los efectos inhibitorios sobre la señalización de la insulina llevados a cabo por el TNF $\alpha$ , un activador de la esfingomielinasa<sup>59</sup>. La ceramida y su análogo, la C<sub>2</sub>-ceramida, inhiben directamente la fosforilación y activación de la Akt/PKB en músculo y adipocitos<sup>60</sup> reduciendo la translocación de GLUT 4 a la membrana y con lo cual el transporte de glucosa. Además la ceramida inhibe también la síntesis de glucógeno en respuesta a insulina en células en cultivo tratadas con palmitato<sup>61</sup>, sugiriendo que un aporte excesivo de palmitato conlleva a la acumulación de ceramidas y esto provoca la pérdida de sensibilidad a la insulina. La ceramida puede ejercer estas acciones mediante varios mecanismos. Una posible vía es la que involucra a la proteína CAPK (*ceramide-activated protein kinase*) que activa la vía ras-MAPK inhibiendo la Akt/PKB<sup>62</sup>, o activando varias PKCs como la PKC  $\zeta$ , que también inhibe la Akt/PKB<sup>63</sup>. Otra posible vía es en la que interviene la proteína fosfatasa activada por ceramida o CAPP, un miembro de la familia de las proteínas fosfatasas 2A (PP2A). La ceramida es capaz de activar la CAPP y inhibir la Akt/PKB mediante su desfosforilación<sup>64</sup>.

En conjunto, todo esto sugiere que la acumulación en músculo de especies derivadas de lípidos como los aciles-CoA de cadena larga, el diacilglicerol y las ceramidas son las responsables de la inhibición de la señalización de la insulina que conlleva a un menor transporte de glucosa y una menor síntesis de glucógeno, promoviendo la resistencia a la insulina. En la figura 2 se recoge un resumen de todas

---

<sup>59</sup> Peraldi P, Hotamisligil GS, Buurman WA, White MF, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor (TNF)-alpha inhibits insulin signalling through stimulation of the p55 TNF receptor and activation of sphingomyelinase. *J Biol Chem* 1996, 271:13018-13022

<sup>60</sup> Summers SA, Garza LA, Zhou H, Birnbaum MJ. Regulation of insulin-stimulated glucose transporter GLUT 4 translocation and Akt kinase activity by ceramide. *Mol Cell Biol* 1998, 18:5457-5464

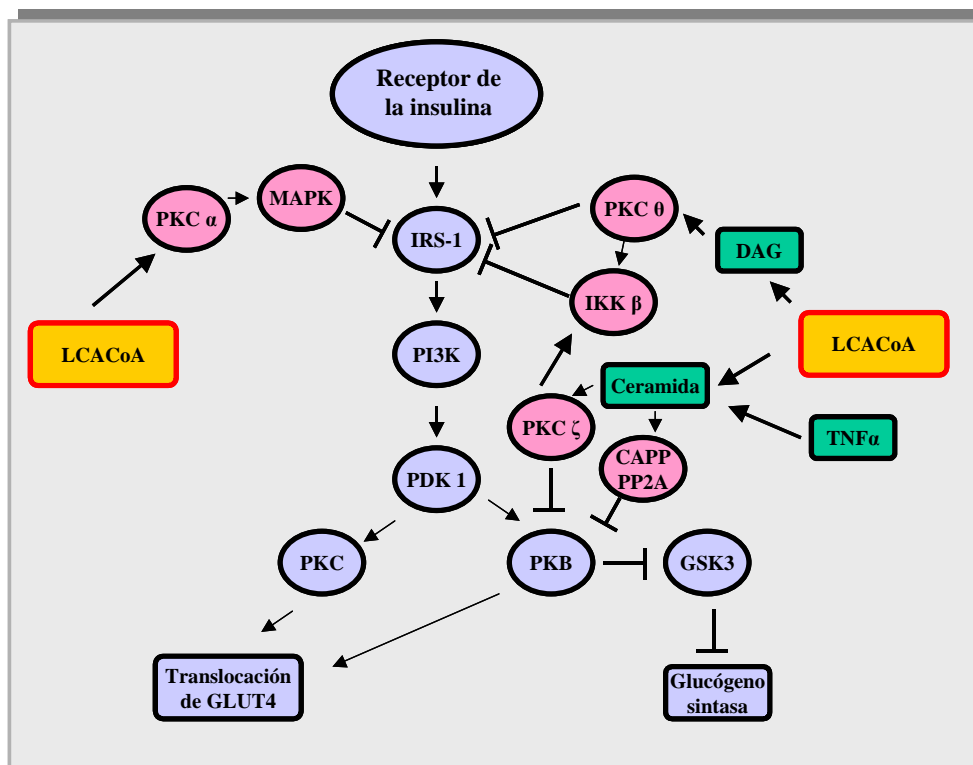
<sup>61</sup> Schmitz-Peiffer C, Craig DL, Biden TJ. Ceramide generation is sufficient to account for the inhibition of the insulin-stimulated PKB pathway in C2C12 skeletal muscle cells pretreated with palmitate. *J Biol Chem*. 1999, 274(34):24202-10.

<sup>62</sup> Basu S, Bayoumy S, Zhang Y. Bad enables ceramide to signal apoptosis via Ras and Raf-1. *J Biol Chem* 1998, 273:30419-30426

<sup>63</sup> Kanoh Y, Brandyopadhyay G, Sajan MP. Thiazolidinedione treatment enhances insulin effects on protein kinase C zeta/lambda activation and glucose transport in adipocytes of nondiabetic and Goto-Kakizaki type II diabetic rats. *J Biol Chem* 2000, 275:16690-16696

<sup>64</sup> Salinas M, Lopez-Valdaliso R, Martín D, Alvarez A, Cuadrado A. Inhibition of PKB/Akt1 by C2-ceramide involves activation of ceramide-activated protein phosphatase in PC12 cells. *Mol Cell Neurosci* 2000, 15:156-169

las acciones llevadas a cabo por los ácidos grasos sobre la cascada de señal de la insulina.



**Figura 2. Acción de los ácidos-CoA de cadena larga (LCACoA) sobre la cascada de señalización de la insulina.** Los ácidos-CoA de cadena larga en sí mismos o a través de las ceramidas y el diacilglicerol (DAG) actúan activando una serie de Ser/Thr quininas o fosfatasa que conducen a una inhibición en la vía de señal de la insulina.

### 2.2.2. Efectos de los ácidos grasos en la biosíntesis de hexosaminas y resistencia a la insulina

Otra vía que ha sido relacionada con el flujo incrementado de ácidos grasos en músculo y la resistencia a la insulina es la biosíntesis de hexosaminas. Ésta es una vía sensible a los niveles energéticos y se activa bajo condiciones de hiperglucemia e hiperinsulinemia. Los ácidos grasos pueden activar esta vía a través de la fructosa-6-fosfato debido a la inhibición de la fosfofructoquinasa 1 o PFK-1 a través de los niveles aumentados de citrato (ciclo glucosa-ácidos grasos). La fructosa-6-fosfato acumulada puede dar lugar a glucosamina-6-fosfato mediante la acción de la enzima

glutamina:fructosa-6-fosfato amidotransferasa (GFAT). Tras unos pasos de acetilación y uridilación se forma el producto final UDP-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc).

La implicación de esta vía en la resistencia a la insulina inducida por ácidos grasos ha sido corroborada por varios estudios: mediante infusión de lípidos en ratas<sup>65</sup> y mediante ratones transgénicos que sobreexpresan la GFAT<sup>66</sup> se ha observado un flujo incrementado a través de esta vía y una inhibición de la acción de la insulina en músculo.

Aunque el mecanismo de acción no es del todo conocido, podría ser que la glucosilación de las proteínas implicadas en la vía de señalización de la insulina jugara un papel muy importante. Por ejemplo, la glucosilación alterada de las proteínas de las vesículas intracelulares que contienen GLUT 4 provocan una menor translocación de estas vesículas a la membrana en respuesta a insulina<sup>67</sup>. Se ha demostrado también una O-glucosilación de IRS-1 y IRS-2 en ratas infundidas con glucosamina, acompañada de una pérdida de sensibilidad a la insulina<sup>68</sup>.

Un mecanismo alternativo por el cual la glucosamina puede inducir resistencia a la insulina en músculo es a través de la activación de PKC. Así, se ha observado una actividad PKC aumentada en la membrana de adipocitos de rata tratados con glucosamina<sup>69</sup>.

### 2.3. RESISTENCIA A LA INSULINA Y OBESIDAD

Otros mecanismos involucrados en la resistencia a la insulina son aquellos que la relacionan con la obesidad. Los individuos obesos presentan un tejido adiposo aumentado, y esto comporta una desregulación importante. El tejido adiposo actúa

---

<sup>65</sup> Hawkins M, Barzilai N, Liu R, Hu MZ, Chen W, Rossetti L. Role of the glucosamine pathway in fat-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 1997, 99:2173-2182

<sup>66</sup> Cooksey RC, Hebert LF, Zhu JH, Wofford P, Garvey WT, McClain DA. Mechanism of hexosamine-induced insulin resistance in transgenic mice overexpressing glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase: decreased glucose transporter GLUT4 translocation and reversal by treatment with thiazolidinedione. *Endocrinology* 1999, 140:1151-1157

<sup>67</sup> Hawkins M, Angelov I, Liu R, Barzilai N, Rossetti L. The tissue concentration of UDP-N-acetylglucosamine modulates the stimulatory effect of insulin on skeletal muscle glucose uptake. *J Biol Chem* 1997, 272:4889-4895

<sup>68</sup> Patti ME, Virkamaki A, Landaker EJ, Kahn CR, Yki-Jarvinen H. Activation of the hexosamine pathway by glucosamine in vivo induces insulin resistance of early postreceptor insulin signaling events in skeletal muscle. *Diabetes* 1999, 48:1562-1571

<sup>69</sup> Filippis A, Clark S, Proietto J. Increased flux through the hexosamine biosynthesis pathway inhibits glucose transport acutely by activation of protein kinase C. *Biochem J* 1997, 324:981-985

como un órgano endocrino, secretando un gran número de proteínas y péptidos involucrados en la homeostasis de energía y la regulación de funciones neuroendocrinas y inmunológicas<sup>70</sup>. Estos factores, que actúan de forma autocrina, paracrina o endocrina para controlar varias funciones metabólicas, se llaman adipoquinas, y varias de ellas se han visto involucradas en la patogénesis de la resistencia a la insulina<sup>71</sup>.

Una de ellas es el TNF $\alpha$ , cuyos efectos se han comentado anteriormente. Otra adipoquina interesante es la leptina. La leptina se produce exclusivamente en el tejido adiposo, ejerce su función central en el hipotálamo y es importante para la correcta regulación del apetito. Sus niveles en sangre se correlacionan con el porcentaje de grasa corporal, de modo que a niveles altos de leptina los niveles de grasa son bajos, y a niveles bajos de leptina los niveles de grasa son altos. Tanto la hiperleptinemia como los niveles muy bajos de leptina están relacionados con la resistencia a la insulina. Se ha sugerido que la leptina mejora la sensibilidad a la insulina haciendo que los ácidos grasos acumulados en tejidos periféricos se redistribuyan y acumulen en el tejido adiposo<sup>72</sup>. Sin embargo, recientemente se ha descrito que la leptina puede contribuir a la resistencia a la insulina, sobretodo en tejido adiposo blanco<sup>73</sup>, a través de una inhibición de la MAPK y la glucógeno sintasa quinasa, así como una inhibición de la fosforilación del receptor de la insulina. De acuerdo con esto, parece que la leptina empeora la sensibilidad a la insulina en tejidos periféricos aislados, pero la mejora *in vivo*<sup>74</sup>.

La interleuquina 6 (IL-6) es una citoquina proinflamatoria y es secretada por el tejido adiposo subcutáneo. Evidencias recientes muestran que la IL-6 también juega un papel importante en la patogénesis de la resistencia a la insulina relacionada con la obesidad<sup>75</sup>. Los efectos de la IL-6 se caracterizan por una reducción de la fosforilación en tirosinas de IRS-1, una asociación disminuida de PI3K y IRS-1 y una inhibición de la

---

<sup>70</sup> Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* 2000, 11:3232-3273

<sup>71</sup> Rangwala SM, Lazar MA. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in diabetes and metabolism. *Trends Pharmacol Sci* 2004, 25:331-336

<sup>72</sup> Shimomura I, Hammer RE, Ikemoto S, Brown MS, Goldstein JL. Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. *Nature* 1999, 401:73-76

<sup>73</sup> Perez C, Fernandez-Galaz C, Fernández-Agullo T, Arribas C, Andres A, Ros M. Leptin impairs insulin signalling in rat adipocytes. *Diabetes* 2004, 53:347-353

<sup>74</sup> Ceddia RB, Koistinen HA, Zierath JR, Sweeney G. Analysis of paradoxical observations on the association between leptin and insulin resistance. *FASEB J* 2002, 1163-1176

<sup>75</sup> Bastard JP, Jardel C, Brucker E, Blondy P, Capeau J, Laville M. Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 2000, 85:3338-3342

activación dependiente de insulina de Akt/PKB. Además, la IL-6 puede reducir la actividad lipoproteína lipasa en el tejido adiposo de ratón, conllevando a una menor hidrólisis de las lipoproteínas ricas en triglicéridos, contribuyendo así a la resistencia a la insulina<sup>76</sup>.

El inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1) es un inhibidor de serina proteasas y su mRNA se ha detectado en tejido adiposo visceral y subcutáneo de ratas obesas<sup>77</sup>. De acuerdo con observaciones experimentales la expresión de PAI-1 incrementa en el tejido adiposo visceral durante el desarrollo de la obesidad y la resistencia a la insulina<sup>78</sup>. Se ha especulado que PAI-1 interfiere con la señalización de la insulina previniendo la cooperación de las integrinas con el receptor de la insulina<sup>79</sup>.

Otra adipoquina importante en el desarrollo de la resistencia a la insulina es la resistina, que fue descubierta originariamente durante una búsqueda de genes que se inducían durante la diferenciación de los adipocitos<sup>80</sup>. La administración de resistina inhibe la acción de la insulina en ratones normales<sup>81</sup> y en ratones alimentados con dieta grasa, los niveles de resistina aumentan y con ello el desarrollo de la resistencia a la insulina<sup>82</sup>. Los efectos nocivos de la resistina en la sensibilidad a la insulina cursan a través de una activación de la glucosa 6-fosfatasa, que provoca una disminución de la síntesis de glucógeno y un incremento de la producción de glucosa. Colectivamente, estos datos sugieren que esta proteína puede estar involucrada en la iniciación de la resistencia a la insulina.

Por último, otra adipoquina interesante es la Acrp30 (*adipocyte complement-related protein*) o adiponectina, una proteína de 30 kDa cuya expresión aumenta 100

---

<sup>76</sup> Liu E, Kitajima S, Higak Y, Marimoto M, Sun H, Watanabe T. High lipoprotein lipase activity increases insulin sensitivity in transgenic rabbits. *Metabolism* 2005, 54:132-138

<sup>77</sup> Eddy AA. Plasminogen activator inhibitor 1 and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002, F209-F220

<sup>78</sup> Shimomura I, Funahashi T, Takahashi M, Maeda K, Kotani K, Nakamura T. Enhanced expression of PAI-1 in visceral fat: possible contributor to vascular disease in obesity. *Nat Med* 1996, 2:800-803

<sup>79</sup> Lopez-Alemay R, Redondo JM, Nagamine Y, Munoz-Canoves P. Plasminogen activator inhibitor type-1 inhibits insulin signalling by competing with alphavbeta3 integrin for vitronectin binding. *Eur J Biochem* 2003, 270:814-821

<sup>80</sup> Holcomb IN, Kabakoff RC, Chan B, Baker TW, Gurney A, Henzel W. FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family. *EMBO J* 2000, 19:4046-4055

<sup>81</sup> Kim KH, Lee K, Moon YS, Sul HS. A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 2001, 276:11252-11256

<sup>82</sup> Muse ED, Obici S, Bhanot S, Monia BP, McKay RA, Rajala MW, Rossetti L. Role of resistin in diet-induced hepatic insulin resistance. *J Clin Invest* 2004, 114:232-239

veces durante la diferenciación de los adipocitos<sup>83</sup>. Contrariamente a lo que sucede con las otras adipoquinas, la expresión de la Acrp30 disminuye en el tejido adiposo de individuos obesos<sup>84</sup>. Además esta proteína tiene efectos beneficiosos en la resistencia a la insulina, y se cree que sus efectos transcurren en parte por un aumento de la oxidación de ácidos grasos en músculo, mediante un mecanismo que involucra la activación de la AMPK<sup>85</sup>.

En resumen, los cambios metabólicos que conlleva la obesidad en el tejido adiposo alteran la expresión de ciertas proteínas con función endocrina. Esta expresión alterada provoca que estas proteínas ejerzan acciones perjudiciales en los tejidos periféricos sensibles a la insulina, induciendo o contribuyendo al desarrollo de la resistencia a la insulina.

#### **2.4. RESISTENCIA A LA INSULINA E INFLAMACIÓN**

La obesidad es una causa muy común de resistencia a la insulina. Como se ha mencionado anteriormente, un mecanismo potencial para su relación es la acumulación ectópica de lípidos. Sin embargo, la obesidad también está asociada con una respuesta inflamatoria sistémica crónica caracterizada por una producción alterada de citoquinas y una activación de vías de señalización proinflamatorias<sup>86</sup>. Trabajos recientes han relacionado esta respuesta inflamatoria con el desarrollo de la resistencia a la insulina a través de dos posibles mecanismos. En primer lugar, la activación de los intermediarios que actúan como señal proinflamatoria puede estar directamente involucrada en la fosforilación en serinas del IRS-1 en hígado y músculo, induciendo resistencia a la insulina. En segundo lugar, la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo puede estar involucrada en la alteración del metabolismo lipídico del adipocito, o en la

---

<sup>83</sup> Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 1995, 270:26746-26749

<sup>84</sup> Hu E, Liang P, Spiegelman BM. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* 1996, 271:10697-10703

<sup>85</sup> Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 2002, 8:1288-1295

<sup>86</sup> Wellen KE, Hotamisligil GS. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003, 112:1785-1788

producción de citoquinas por parte del tejido adiposo, que a su vez puede tener consecuencias importantes en otros tejidos metabólicamente importantes<sup>87</sup>.

Citoquinas inflamatorias como el TNF $\alpha$  y la interleuquina 6 (IL-6) han sido relacionadas con la resistencia a la insulina desde hace tiempo. Por ejemplo, en obesidad los niveles de TNF $\alpha$  se encuentran aumentados tal y como se ha descrito anteriormente. Otro intermediario de la respuesta inflamatoria, el IKK $\beta$  se ha relacionado también con la resistencia a la insulina. Así, Yuan y colaboradores<sup>88</sup> demostraron que uno de los mecanismos por el cual los ácidos grasos inducían la fosforilación en serinas del IRS-1 era a través de IKK $\beta$ . Esta hipótesis ha sido apoyada por el hecho que el tratamiento con salicilato (un inhibidor de IKK $\beta$ ) a altas dosis mejora la resistencia a la insulina en roedores obesos durante una alimentación con dieta grasa o una infusión de lípidos<sup>89</sup>. También se ha demostrado que el tratamiento durante 2 semanas con salicilato mejora la resistencia a la insulina en pacientes con diabetes de tipo 2<sup>90</sup>.

Hotamisligil y colaboradores<sup>91</sup> han identificado otra serina kinasa proinflamatoria involucrada en la fosforilación en serinas de IRS-1, la JNK1 (*Jun kinase 1*). Esta citoquina tiene una actividad aumentada en roedores obesos y tejido adiposo humano, y ratones *knock out* en JNK1 tienen una adiposidad reducida y una mayor sensibilidad a la insulina. Cualquier modulación de los niveles de JNK1 ya sea por sobreexpresión o por inhibición de su actividad se correlaciona directamente con los niveles de fosforilación en serinas de IRS-1 y la resistencia a la insulina.

Otra molécula que relaciona inflamación y resistencia a la insulina es SOCS3 (*suppressor of cytokine signalling 3*)<sup>92</sup>. La familia de proteínas SOCS participan en la

---

<sup>87</sup> Hotamisligil GS. Inflammatory pathways and insulin action. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003, 27(suppl 3): S53-S55

<sup>88</sup> Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M, Shoelson SE. Reversal of obesity and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science*. 2001, 293:1673-1677

<sup>89</sup> Kim JK, Kim YJ, Fillmore JJ, Chen Y, Moore I, Lee J, Yuan M, Li ZW, Karin M, Perret P, Shoelson SE, Shulman GI. Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate. *J Clin Invest* 2001, 108:437-446

<sup>90</sup> Hundal RS, Petersen KF, Mayerson AB, Randhawa PS, Inzucchi S, Shoelson SE, Shulman GI. Mechanism by which high-dose aspirin improves glucose metabolism in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 2002, 109:1321-1326

<sup>91</sup> Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 2002, 420:333-336

<sup>92</sup> Ueki K, Kondo T, Kahn CR. Suppressor of cytokine signalling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms. *Mol Cell Biol* 2004, 24:5434-5446



regulación negativa de la señalización de las citoquinas. Su expresión se encuentra incrementada mediante la señalización de citoquinas a través de la activación de transductores de señal, activadores de la transcripción y el NF- $\kappa$ B. Estudios *in vitro* sugieren que SOCS3 interactúa directamente con el receptor de la insulina, inhibiendo la fosforilación de IRS-1 en tirosinas y reduciendo la síntesis de glucógeno en miotubos en cultivo. Interesantemente, dos artículos recientes han demostrado la presencia de niveles elevados de SOCS3 en roedores obesos<sup>92,93</sup>.

Por último, está bajo discusión si la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo, que se ve aumentada en la obesidad, está involucrada en este proceso de resistencia a la insulina ligada a la inflamación. Xu y colaboradores<sup>94</sup> sugieren que el incremento en la expresión de genes proinflamatorios en el tejido adiposo precede al incremento en los niveles plasmáticos de insulina en ratones alimentados con dieta grasa. Además estos ratones muestran también una disminución de la expresión de genes derivados de macrófagos en respuesta al tratamiento con un agente sensibilizador a la insulina (rosiglitazona).

## **2.5. ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS EN EL TRATAMIENTO DE LA RESISTENCIA A LA INSULINA**

Como se ha comentado anteriormente, la resistencia a la insulina precede al desarrollo de la diabetes de tipo 2 y es el mejor predictor de su desarrollo en los descendientes de pacientes diabéticos. Por esta razón, el desarrollo de intervenciones terapéuticas para la resistencia a la insulina es de vital importancia para prevenir el desarrollo de la diabetes de tipo 2 y sus complicaciones asociadas.

Los avances realizados en la comprensión de las vías moleculares que subyacen bajo la acción de la insulina y el metabolismo intermediario ofrecen un número de nuevas oportunidades para el desarrollo de nuevas intervenciones terapéuticas. Avances recientes en los mecanismos de transducción de señal y diferenciación celular han conducido a nuevas aproximaciones para el tratamiento de la resistencia a la insulina. Uno de los mayores retos de este esfuerzo es la necesidad de conseguir moléculas que

---

<sup>93</sup> Shi H, Tzamelis I, Bjorbaek C, Flier JS. Suppressor of cytokine signalling 3 is a physiologic regulator of adipocyte insulin signalling. *J Biol Chem* 2004;279:34733-34740

<sup>94</sup> Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 2003, 112:1821-1830

tengan su impacto en el metabolismo sin alterar otras vías que puedan conducir a efectos secundarios no deseados. Por lo tanto es necesario tener en cuenta la distribución de los tejidos, la localización celular y la selectividad cuando se diseñan fármacos moduladores de enzimas o receptores.

A continuación se detallan diversas estrategias para el tratamiento de la resistencia a la insulina y la diabetes de tipo 2.

### 2.5.1. Reducción de los lípidos intramiocelulares

Como se ha mencionado anteriormente, la acumulación de lípidos dentro de las fibras musculares contribuye significativamente a la aparición y al desarrollo de la resistencia a la insulina, por lo tanto, su reducción es una buena estrategia terapéutica. En este sentido se utilizan un conjunto de fármacos denominados tiazolidindionas (TZD). Las tiazolidindionas reducen los niveles plasmáticos de glucosa y consecuentemente disminuyen la hiperinsulinemia mejorando la estimulación de la captación de glucosa y la inhibición de la producción hepática de glucosa por la insulina. Además provocan una mejora sustancial de la resistencia a la insulina en músculo<sup>95</sup>, estimulando la captación de glucosa estimulada por insulina conduciendo a una mayor síntesis de glucógeno y una mayor oxidación de glucosa.

La acción de estos compuestos versa a través de la activación del PPAR $\gamma$  (*peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$* )<sup>96</sup>, un miembro de la superfamilia de receptores nucleares de factores de transcripción. Aunque los ligandos del PPAR $\gamma$  no son del todo conocidos, han sido propuestos diferentes lípidos<sup>97</sup> y las prostaglandinas<sup>98</sup>. El PPAR $\gamma$  forma un heterodímero con el receptor RXR (*retinoid X receptor*) y este heterodímero se une a elementos de respuesta a PPAR (PPREs) presentes en los

---

<sup>95</sup> Petersen KF, Krssak M, Inzucchi S, Cline GW, Dufour S, Shulman GI. Mechanism of troglitazone action in type 2 diabetes. *Diabetes* 2000, 49:827-831

<sup>96</sup> Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkinson WO, Wilson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for PPAR $\gamma$ . *J Biol Chem* 1995, 270:12953-12956

<sup>97</sup> Kliewer SA, Sundseth SS, Jones SA, Brown PJ, Wisely GB, Koble CS, Devchand P, Wahli W, Willson TM, Lenhard JM, Lehmann JM. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with PPAR- $\alpha$  and PPAR- $\gamma$ . *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94:4318-4323

<sup>98</sup> Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* 1995, 83:803-812

promotores de sus genes diana, reclutando una histona acetilasa y activando la transcripción<sup>99</sup>.

La activación de PPAR $\gamma$  por ligandos se correlaciona bien con los efectos antidiabéticos de estos agentes, sugiriendo que la expresión regulada de los genes que responden a PPAR $\gamma$  participa en los efectos de sensibilización a la insulina. Sin embargo ha sido difícil identificar qué genes exactamente son los responsables de esta reversión de la resistencia a la insulina. La mayoría de los genes conocidos que responden a TZDs codifican para proteínas lipogénicas que están asociadas con la diferenciación de los adipocitos. De esta manera las TZDs bajan los niveles plasmáticos de ácidos grasos y pueden redistribuir los lípidos desde los tejidos sensibles a la insulina como hígado y músculo hacia los adipocitos<sup>100</sup>. Además de los efectos mediados a través de su acción en el tejido adiposo, las TZDs pueden también actuar directamente sobre músculo esquelético<sup>100</sup>. Así, estudios realizados *in vitro* han mostrado que un tratamiento crónico de células de músculo esquelético con TZDs aumenta la oxidación de lípidos<sup>101</sup>. Además los efectos del tratamiento con TZD en la disminución de lípidos intramiocelulares también ha sido demostrado en humanos<sup>102</sup>.

No obstante, las TZD tienen efectos secundarios. Así, tras un tratamiento largo el incremento en la masa del tejido adiposo provocado por las TZDs conduce a resistencia a la insulina, además de un aumento en los niveles de colesterol-LDL, retención de fluidos, hepatotoxicidad y hipertrofia cardíaca<sup>103</sup>.

Otra terapia no farmacológica para disminuir los lípidos intramiocelulares y aumentar la sensibilidad a la insulina es el ejercicio. Los lípidos intramiocelulares sirven como reserva energética y son utilizados durante el ejercicio, con lo cual sus niveles pueden disminuir siguiendo un protocolo de ejercicio físico. La capacidad oxidativa del

---

<sup>99</sup> Glass CK, Rosenfeld MG. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* 2000, 14:121-141

<sup>100</sup> Furnsinn C, Waldhausl W. Thiazolidinediones: metabolic actions in vitro. *Diabetologia* 2002, 45:1211-1223

<sup>101</sup> Ciaraldi TP, Cha BS, Park KS, Carter L, Mudaliar SR, Henry RR. Free fatty acid metabolism in human skeletal muscle is regulated by PPAR gamma and RXR agonists. *Ann N Y Acad Sci* 2002, 967:66-70

<sup>102</sup> Mayerson AB, Hundal RS, Dufour S, Lebon V, Befroy D, Cline GW, Enocksson S, Inzucchi SE, Shulman GI, Petersen KF. The effects of rosiglitazone on insulin sensitivity, lipolysis, and hepatic and skeletal muscle triglyceride content in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 2002, 51:797-802

<sup>103</sup> Schoonjans K, Auwerx J. Thiazolidinediones: an update. *Lancet* 2000, 355:1008-1010

músculo se encuentra aumentada en atletas<sup>104</sup>, indicando que el ejercicio prolongado puede retrasar la disminución de la oxidación de lípidos observado con la edad y la resistencia a la insulina asociada.

En resumen, una disminución de los niveles de lípidos intramiocelulares ya sea por una intervención farmacológica o mediante un protocolo de ejercicio físico, conlleva una importante mejora de la sensibilidad a la insulina en músculo.

### 2.5.2. Modulación de las vías proinflamatorias

Otra estrategia terapéutica versa a través de la modulación de las vías proinflamatorias, que se han visto también involucradas en el desarrollo de la resistencia a la insulina. Un fármaco que tiene su acción en esta vía es el salicilato. Así, altas dosis de este compuesto, que inhibe IKK $\beta$  y por lo tanto la activación de NF- $\kappa$ B, revierten la resistencia a la insulina provocada por ácidos grasos en roedores<sup>89</sup> y pacientes con diabetes de tipo 2<sup>90</sup> tal y como se ha mencionado anteriormente. Interesantemente, las TZDs también tienen propiedades anti-inflamatorias en diabéticos<sup>105</sup> y obesos<sup>106</sup>.

Recientemente se ha cuestionado el concepto de que IKK $\beta$  está involucrado directamente en la mediación de la resistencia a la insulina. Se ha demostrado que la disrupción del gen de IKK $\beta$  en músculo esquelético no previene la resistencia a la insulina provocada por una dieta rica en grasas en ratón<sup>107</sup>.

Así, la inhibición farmacológica de la vía IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B puede representar una posible diana para el tratamiento de la resistencia a la insulina, aunque son necesarios más estudios para esclarecer los mecanismos involucrados en este proceso.

---

<sup>104</sup> Kelley DE, Mandarino LJ. Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination. *Diabetes* 2000, 49:677-683

<sup>105</sup> Aljada A, Garg R, Ghanim H. Nuclear factor-kappaB suppressive and inhibitor kappaB stimulatory effects of troglitazone in obese patients with type 2 diabetes: evidence of an anti-inflammatory action? *J Clin Endocrinol Metab* 2001, 86:3250-3256

<sup>106</sup> Ghanim H, Garg R, Aljada A. Suppression of nuclear factor-kappaB and stimulation of inhibitor kappaB by troglitazone: evidence for an anti-inflammatory effect and a potential antiatherosclerotic effect in the obese. *J Clin Endocrinol Metab* 2001, 86:1306-1312

<sup>107</sup> Rol M, Papanikolaou M, Baudier S. Conditional disruption of IkappaB kinase 2 fails to prevent obesity-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 2004, 113:474-481

### 3. METABOLISMO DE ÁCIDOS GRASOS EN MÚSCULO ESQUELÉTICO

El músculo esquelético es principal lugar de oxidación de ácidos grasos tanto en situaciones de reposo como durante el ejercicio. En condiciones de reposo y especialmente en ayuno, los ácidos grasos son el principal sustrato energético del músculo. Durante un ejercicio de baja intensidad, el metabolismo se eleva varias veces comparado con situaciones de reposo aumentando también la oxidación de ácidos grasos. Cuando la intensidad del ejercicio aumenta, la oxidación de ácidos grasos aumenta de la misma forma, hasta que la intensidad del ejercicio llega al 65% de la capacidad máxima ( $VO_2$  máx.), tras el cual la oxidación de ácidos grasos disminuye. Contrariamente al metabolismo de los carbohidratos, que incrementa en función de los niveles de trabajo aeróbico, la oxidación de grasas está reducida durante un ejercicio de alta intensidad<sup>108</sup>.

#### 3.1. UTILIZACIÓN DE LÍPIDOS EN MÚSCULO EN REPOSO Y DURANTE EJERCICIO

Después de un ayuno de toda la noche, la mayoría de la energía necesitada en reposo está cubierta por la oxidación de ácidos grasos provenientes del tejido adiposo. La lipólisis en el tejido adiposo depende mayoritariamente de las concentraciones de epinefrina (estimula la lipólisis) y insulina (inhibe la lipólisis). Cuando se inicia el ejercicio se incrementa la lipólisis y con ello la liberación de ácidos grasos en el tejido adiposo. Durante un ejercicio de intensidad moderada, la lipólisis aumenta aproximadamente tres veces<sup>109</sup>, principalmente debido a una estimulación  $\beta$ -adrenérgica a través de la epinefrina. Además, bajo estas condiciones, el flujo sanguíneo al tejido adiposo se dobla y la esterificación de ácidos grasos disminuye a la mitad. Además, en músculo el flujo de sangre aumenta dramáticamente y por lo tanto lo hace también el aporte de ácidos grasos. Durante los primeros 15 minutos, generalmente los niveles de ácidos grasos disminuyen en plasma debido a que la captación por parte del músculo supera los niveles de lipólisis del tejido adiposo. Después los niveles de ácidos grasos

---

<sup>108</sup> Achten J, Gleeson M, Jeukendrup AE. The relation between maximal fat oxidation and exercise intensity. *Med Sci Sports Exercise* 2002, 34:92-97

<sup>109</sup> Wolfe RR, Klein S, Carraro F, Weber JM. Role of triglyceride-fatty acid cycle in controlling fat metabolism in humans during and after exercise. *Am J Physiol* 1990, 258: E383-E389

aumentan, ya que la velocidad de lipólisis aumenta más que la de captación por el músculo. Así, los niveles plasmáticos de ácidos grasos dependen de la duración e intensidad del ejercicio. Durante un ejercicio moderado, la concentración plasmática de ácidos grasos puede llegar a 1 mM durante 60 min de ejercicio, mientras que a intensidades más altas de ejercicio, este incremento es mucho menor o inexistente.

Durante un ejercicio de alta intensidad, la oxidación de ácidos grasos en músculo disminuye aunque la lipólisis sigue aumentada. En estas condiciones el flujo sanguíneo en el tejido adiposo disminuye debido a una vasoconstricción llevada a cabo por el sistema nervioso simpático, y esto conlleva una menor salida de ácidos grasos. Además, la acumulación de lactato observada bajo estas condiciones puede inhibir la lipólisis o aumentar la reesterificación de los ácidos grasos<sup>110</sup>. Todo esto favorece la utilización de la glucosa plasmática y el glucógeno como sustratos energéticos.

El control de todo este proceso viene determinado por la disponibilidad de ácidos grasos (lipólisis y suministro por parte del tejido adiposo y flujo sanguíneo en el músculo). Durante el ejercicio de baja y moderada intensidad existen algunas evidencias de la existencia del ciclo de la glucosa-ácidos grasos en la regulación de la utilización de los ácidos grasos como sustratos<sup>111</sup>, sin embargo la mayor parte de esta regulación parece ser llevada a cabo por la desactivación de la glucógeno fosforilasa (encargada de la lisis del glucógeno para proporcionar glucosa) y posiblemente de la piruvato deshidrogenasa (PDH). Durante el ejercicio de alta intensidad esta regulación es llevada a cabo exclusivamente por la glucógeno fosforilasa.

### **3.2. REGULACIÓN DEL METABOLISMO DE LÍPIDOS EN MÚSCULO ESQUELÉTICO**

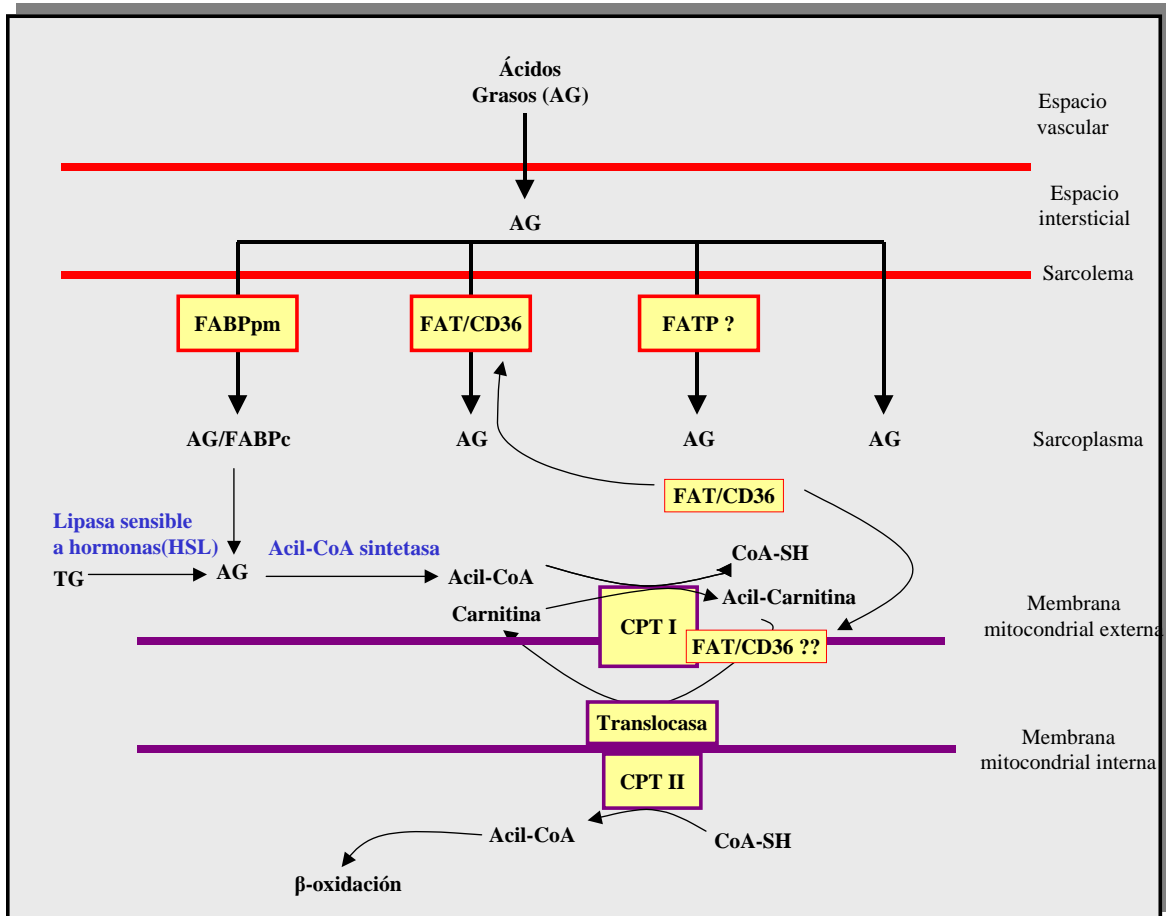
Aunque la disponibilidad de ácidos grasos así como la regulación de la lipólisis en el tejido adiposo juega un papel muy importante en la utilización de lípidos en músculo, la regulación a nivel muscular es también fundamental. Existen varios puntos de regulación del metabolismo de lípidos en músculo (figura 3). Entre ellos figuran: 1) el transporte de los ácidos grasos desde el espacio vascular a través del sarcolema hacia el sarcoplasma, 2) la liberación de los ácidos grasos de los triglicéridos bajo la

---

<sup>110</sup> Boyd AE, Ciamber SR, Mager M, Lebovitz HE. Lactate inhibition of lypolysis in exercising man. *Metabolism* 1974, 23:531-542

<sup>111</sup> Odland LM, Heigenhauser GD, Lopaschuck GD, Spriet LL. Effect of increased fat availability on fat carbohydrate interaction during prolonged exercise in men. *Am J Physiol* 1996, 274:R894-R902

influencia de la lipasa sensible a hormonas y 3) el transporte de los ácidos grasos a través de la membrana mitocondrial externa, involucrando a la enzima carnitina palmitoiltransferasa I (CPT I). Una vez en la matriz mitocondrial, los ácidos grasos son metabolizados mediante la  $\beta$ -oxidación, la cual no se cree que juegue un papel importante en la regulación ya que ninguno de los enzimas implicado parece estar regulado.



**Figura 3. Transporte de los ácidos grasos desde el espacio vascular hasta la mitocondria.** Los ácidos grasos atraviesan el sarcolema a través de proteínas transportadoras o posiblemente por difusión. Una vez en el sarcoplasma son activados a acil-CoA y se transportan unidos a FABPc (*fatty acid binding protein*). Los ácidos grasos se transportan al interior de la mitocondria por la acción del sistema CPT y posiblemente con la ayuda de FAT/CD36 y una vez en la matriz mitocondrial pueden ser oxidados.

### 3.2.1. Transporte de ácidos grasos dentro de la célula muscular

Los ácidos grasos provenientes de la lipólisis del tejido adiposo son transportados unidos a la albúmina en la sangre y posteriormente deben ser transportados al interior de los tejidos. Durante largo tiempo se creyó que el transporte de ácidos grasos al interior del músculo era un proceso pasivo. Sin embargo, recientemente se han identificado proteínas transportadoras específicas en varios tejidos, entre ellos el músculo esquelético. En el sarcolema (membrana plasmática de la célula muscular) se localizan dos proteínas involucradas en el transporte de ácidos grasos. Éstas son la proteína de unión a ácidos grasos específica de membrana plasmática o FABPpm, y la translocasa de ácidos grasos o FAT/CD36. Se ha identificado una tercera proteína, la proteína transportadora de ácidos grasos o FATP, pero su papel en el transporte se ha cuestionado debido a que su contenido en el sarcolema está inversamente correlacionado con la transporte de ácidos grasos, mientras que la cantidad de FABPpm y FAT/CD36 lo están directamente.

El transporte de ácidos grasos dentro del músculo es un proceso regulado. Por ejemplo, después de un ayuno<sup>112</sup> o tras un entrenamiento físico<sup>113</sup>, los niveles de FABPpm incrementan en la membrana plasmática. Lo mismo ocurre con FAT/CD36, cuyos niveles en la membrana están regulados. FAT/CD36 es una glicoproteína integral de membrana de 88 KDa con un papel importante en la captación de ácidos grasos. Así, su sobreexpresión en ratón provoca una reducción de los niveles plasmáticos de ácidos grasos y incrementa la oxidación de palmitato en músculo en contracción<sup>114</sup>. Esta proteína se transloca desde vesículas intracelulares a la membrana plasmática de una forma similar a como lo hace el transportador de glucosa GLUT4<sup>115</sup>, sugiriendo un mecanismo de regulación aguda del transporte de ácidos grasos. La contracción estimula el contenido de FAT/CD36 en la membrana plasmática al mismo tiempo que lo reduce en el sarcoplasma, y junto con esto se observa un mayor transporte de ácidos

---

<sup>112</sup> Turcotte LP, Srivastava AK, Chiasson JL. Fasting increases plasma membrane fatty acid-binding protein (FABPpm) in red skeletal muscle. *Mol Cell Biochem* 1997, 166:153-158

<sup>113</sup> Kiens BS, Kristiansen P, Jensen P. Membrane associated fatty acid binding protein (FABPpm) in human skeletal muscle is increased by endurance training. *Biochem Biophys Res Commun* 1997, 231:463-465

<sup>114</sup> Ibrahim A, Bonen A, Blinn WD, Hajri T, Li X, Zhong K, Cameron R, Abumrad NA. Muscle-specific overexpression of FAT/CD36 enhances fatty acid oxidation by contracting muscle, reduces plasma triglycerides and fatty acids, and increases plasma glucose and insulin. *J Biol Chem* 1999, 274:26761-26766

<sup>115</sup> Bonen A, Luiken JJ, Arumugan Y. Acute regulation of fatty acid uptake involves the cellular redistribution of fatty acid translocase. *J Biol Chem* 2000, 275:14501-14508



grasos. No se conoce el mecanismo que activa esta translocación, sin embargo es tentador especular que puedan influir factores similares a los que provocan la translocación de GLUT4. Sin embargo existe cierta controversia en este aspecto, ya que mediante inmunocitoquímica, algunos estudios demuestran la presencia de FAT/CD36 asociada a la membrana pero no en compartimentos intracelulares<sup>116</sup>. Algunos autores sugieren que la presencia intracelular de esta proteína podría deberse a las proteínas acabadas de sintetizar que viajan hacia la membrana más que a la presencia de proteína madura secuestrada en un compartimento intracelular<sup>117</sup>. Recientemente, mediante fraccionamiento subcelular se ha demostrado la presencia de FAT/CD36 en mitocondrias de gastrocnemius de rata<sup>118</sup> y en humanos<sup>119</sup>. Considerando los datos inmunohistoquímicos, este hallazgo es sorprendente pero puede deberse al hecho que posiblemente la FAT/CD36 localizada en la mitocondria tenga el epítipo contra el cual se han diseñado los anticuerpos para inmunocitoquímica insertado en la membrana mitocondrial, y por lo tanto accesible sólo cuando las estructuras de la membrana se degradan durante la obtención del lisado celular para Western blot. La posible función de esta proteína en la membrana mitocondrial será discutida más adelante.

En resumen, los transportadores de ácidos grasos son probablemente los responsables de la mayor parte del transporte de éstos a través del sarcolema, y estos transportadores pueden ser regulados tanto crónicamente como de forma aguda. Sin embargo, por el momento no se conocen situaciones fisiológicas en las cuales el transporte de ácidos grasos sea limitante, y tampoco se conocen los mecanismos involucrados en la regulación de estos transportadores.

---

<sup>116</sup> Vistisen B, Roepstorff K, Roepstorff C, Bonen A, van Deurs B, Kiens B. Sarcolemmal FAT/CD36 in human skeletal muscle colocalizes with caveolin-3 and is more abundant in type 1 than type 2 fibers. *J Lipid Res* 2004, 45:603-609

<sup>117</sup> Alessio M, De Monte L, Scirea A, Guarini P, Tandon NN, Sitia R. Synthesis, processing, and intracellular transport of CD36 during monocytic differentiation. *J Biol Chem* 1996, 271:1770-1775

<sup>118</sup> Campbell SE, Tandon NN, Woldergioris G, Luiken JJ, Glatz JF, Bonen A. A novel function for fatty acid translocase FAT/CD36: involvement in long chain fatty acid transfer into the mitochondria. *J Biol Chem* 2004, 279:36235-36241

<sup>119</sup> Bezaire V, Bruce CR, Heigenhauser GJF, Tandon NN, Glatz JF, Luiken JJ, Bonen A, Spriet LL. Identification of fatty acid translocase on human skeletal muscle mitochondrial membranes: essential role in fatty acid oxidation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005

### 3.2.2. Lisis de los triglicéridos intramiocelulares (IMTG)

Los triglicéridos intramiocelulares o IMTG son muy importantes para proveer de energía al músculo bajo situaciones de ejercicio. En individuos entrenados físicamente se encuentran localizados adyacentes a las mitocondrias como vesículas o gotas lipídicas (*lipid droplets*), mientras que en individuos no entrenados esta localización no está tan clara<sup>120</sup>.

La rotura de los IMTG está regulada por una lipasa de forma similar al tejido adiposo. Aunque la regulación de estas lipasas se ha estudiado intensamente en una gran variedad de tejidos, la regulación de la lipasa de músculo esquelético no ha sido extensamente estudiada. Langfort y colaboradores<sup>121</sup> demostraron la presencia de la lipasa sensible a hormonas (HSL) en músculo esquelético. El contenido en HSL se correlaciona directamente con el contenido de TG en músculo en los diferentes tipos de fibras musculares, siendo mayor en las fibras oxidativas y menor en las fibras glucolíticas. La epinefrina (estimulación  $\beta$ -adrenérgica) activa la HSL vía la proteína quinasa activada por AMP cíclico (AMPC). Además, la contracción muscular también activa la HSL independientemente de la estimulación adrenérgica. Los mecanismos moleculares que conllevan a la activación de la HSL no se conocen, aunque se cree que la fosforilación podría estar involucrada. Estudios en humanos y ratas<sup>122</sup> han demostrado una activación simultánea de la HSL intramuscular y la glucógeno fosforilasa durante el ejercicio, sugiriendo una activación paralela y similar de ambas enzimas durante el ejercicio.

Es importante resaltar que a intensidades de ejercicio altas, aún después de incrementos en los niveles circulantes de epinefrina, la oxidación de lípidos disminuye. Así, otros factores dentro del músculo deben de ser responsables de la inhibición de la oxidación de ácidos grasos a estas intensidades de ejercicio.

---

<sup>120</sup> Hoppeler H, Howald H, Conley KE. Endurance training in humans: aerobic capacity and structure of skeletal muscle. *J Appl Physiol* 1985, 59:320-327

<sup>121</sup> Langfort J, Ploug T, Ihlemann J. Expression of hormone sensitive lipase and its regulation by adrenaline in skeletal muscle. *Biochem J* 1999, 340:459-465

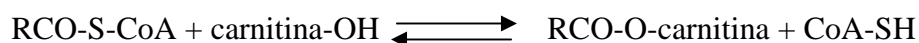
<sup>122</sup> Langfort J, Ploug T, Ihlemann J. Stimulation of hormone-sensitive lipase activity by contractions in rat skeletal muscle. *Biochem J* 2000, 351:207-214

### 3.2.3. Activación de ácidos grasos a aciles-CoA

Una vez en el sarcoplasma, y antes de ser utilizados, los ácidos grasos son activados a aciles-CoA por la acción de la acil-CoA sintetasa de cadena larga (LCAS), que es abundante en mitocondrias, peroxisomas y retículo endoplasmático<sup>123</sup>. La LCAS se encuentra asociada a la membrana mitocondrial externa con el sitio activo del enzima expuesto al citoplasma<sup>124</sup>.

La esterificación de los ácidos carboxílicos a coenzima A (CoA) a través de un enlace tioéster es una estrategia común usada en procesos metabólicos para “activar” un metabolito relevante. Esta activación tiene dos consecuencias: en primer lugar mantiene el acil-CoA formado impermeable a las membranas celulares, y en segundo lugar secuestra el CoA de los acúmulos limitados que existen en los compartimentos subcelulares. Como resultado, los aciles-CoA se mantienen separados en los diferentes compartimentos celulares, lo cual es muy importante debido a la alta actividad biológica mostrada por alguno de ellos. Consecuentemente, la célula posee un mecanismo para el control de las concentraciones de ésteres de CoA que es rápido y no involucra las energéticamente costosas hidrólisis y resíntesis de los ésteres.

La célula consigue todos estos requerimientos gracias a un simple mecanismo, la transesterificación entre los aciles-CoA y la L-carnitina para formar el correspondiente éster de carnitina y regenerar el CoA según la reacción:



Estas reacciones están catalizadas por una familia de proteínas denominadas carnitina aciltransferasas<sup>125</sup>. La familia está compuesta por diferentes enzimas, distinguiéndose entre ellas por la afinidad hacia la longitud de la cadena del ácido graso que utilizan como sustrato. La carnitina acetiltransferasa<sup>126</sup> o CAT actúa como acetil-CoA como sustrato, mientras que la carnitina octanoiltransferasa o COT facilita el transporte de los ácidos grasos de cadena media (C8-C10) de los peroxisomas a las

<sup>123</sup> Watkins PA. Fatty acid activation. *Prog Lipid Res* 1997, 36:55-83

<sup>124</sup> Hesler CB, Olymbios C, Haldar D. Transverse-plane topography of long-chain acyl-CoA synthetase in the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem* 1990, 265: 6600-6605

<sup>125</sup> Zammit VA. Carnitine acyltransferases: functional significance of subcellular distribution and membrane topology. *Progress in lipid research* 1999, 38:199-224

<sup>126</sup> Bieber LL. Carnitine. *Annu Rev Biochem* 1988, 57:261-283

mitocondrias a través de la conversión de los ácidos grasos acortados tras la  $\beta$ -oxidación peroxisomal a acil-carnitina<sup>127</sup>. La  $\beta$ -oxidación peroxisomal no proporciona energía directamente pero es capaz de acortar los ácidos grasos de cadena muy larga, preparándolos para la posterior  $\beta$ -oxidación mitocondrial. La COT tiene también una importante acción detoxificadora oxidando moléculas como eicosanoides y xenobióticos. Finalmente, las carnitina palmitoiltransferasas<sup>128</sup> (CPTs) I y II facilitan el transporte de los ácidos grasos de cadena larga (C16) a la matriz mitocondrial, donde son utilizados para la  $\beta$ -oxidación.

Una característica que diferencia a las diferentes carnitina aciltransferasas es su sensibilidad a la inhibición por malonil-CoA. La CPT I y la COT son sensibles a malonil-CoA, mientras que la CPT II y la COT no lo son<sup>128</sup>.

La activación de los ácidos grasos a ésteres de CoA no es un punto importante para el control y regulación de la oxidación de ácidos grasos. Sin embargo, la acil-CoA sintetasa está sujeta a un control mediante la disponibilidad del sustrato y la desaparición del producto de reacción. Se ha sugerido que como la concentración citosólica del CoA libre (CoA-SH) es igual o menor que la  $K_m$  del enzima, la disponibilidad de CoA-SH puede influenciar la actividad del enzima y por lo tanto la  $\beta$ -oxidación<sup>129</sup>. En hepatocitos, el uso de troglitazona como un inhibidor de la acil-CoA sintetasa mitocondrial y peroxisomal demostró que la actividad de la enzima podía afectar la  $\beta$ -oxidación y al reparto de los ácidos grasos entre  $\beta$ -oxidación y la síntesis de triglicéridos y fosfolípidos<sup>130</sup>.

### 3.2.4. Transporte de ácidos grasos a través del citoplasma

Los aciles-CoA son moléculas insolubles en agua, con lo cual necesitan unirse a proteínas específicas para poder ser transportadas a través del citoplasma. Estas proteínas son la FABPs o proteínas que unen ácidos grasos. Además de éstas, se

---

<sup>127</sup> Ferdinandusse S, Mulders J, Ijlst L, Denis S, Dacremont G, Waterham HR, Wanders RJ. Molecular cloning and expression of human octanoyltransferase: evidence for its role in the peroxisomal  $\beta$ -oxidation of branched-chain fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun* 1999, 263:213-218

<sup>128</sup> McGarry JD, Brown NF. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem* 1997, 244:1-14

<sup>129</sup> Oram JF, Wenger JI, Neeley JR. Regulation of long chain fatty acid activation in heart muscle. *J Biol Chem* 1975, 250:73-78

<sup>130</sup> Fulgencio JP, Col C, Girard J, Pegorier JP. Troglitazone inhibits fatty acid oxidation and esterification, and gluconeogenesis in isolated hepatocytes from starved rats. *Diabetes* 1996, 45:1556-1562

identificó otra proteína, la ACBP, que tiene 1.000 veces más afinidad por los aciles-CoA de 14-22 átomos de carbono, y una afinidad mucho menor por los ácidos grasos libres y los ésteres de carnitina. Esta proteína se encuentra expresada de forma ubicua en todos los tejidos y su concentración en el citoplasma es 10 veces menor que la de las FABPs. Debido a la alta afinidad de la ACBP por los aciles-CoA cabría esperar que los aciles-CoA no estuvieran disponibles para la  $\beta$ -oxidación o para la síntesis de triglicéridos. Sin embargo, diversos estudios han mostrado que los aciles-CoA unidos a la ACBP son sustrato para la CPT I<sup>131</sup> y para la síntesis microsomal de triglicéridos y fosfolípidos<sup>132</sup>. Se ha sugerido que la transferencia del acil-CoA entre la ACBP y la CPT I se da cabo gracias a un cambio conformacional inducido por la interacción entre la ACBP y la CPT I<sup>133</sup>.

El papel de la ACBP *in vivo* y si la unión del acil-CoA a la ACBP es importante en el control de la oxidación de ácidos grasos es poco conocido, debido en gran medida a la falta de inhibidores específicos. En un estudio reciente realizado a cabo en células de hepatoma que sobreexpresan la ACBP, se ha observado un flujo incrementado de ácidos grasos hacia la síntesis de triglicéridos y un flujo disminuido hacia la  $\beta$ -oxidación<sup>134</sup>, sugiriendo un papel de la ACBP en el reparto de los aciles-CoA hacia la oxidación o la esterificación.

### 3.2.5. Metabolismo de ácidos grasos en la mitocondria

Los aciles-CoA pueden ser utilizados para la síntesis de triglicéridos o transportarse al interior de la mitocondria para ser oxidados. Este transporte es llevado a cabo por la acción coordinada de la CPT I, carnitina:acilcarnitina translocasa (CACT) y CPT II. El paso catalizado por la CPT I es uno de los más regulados en la oxidación de

---

<sup>131</sup> Abo-Hashema KAH, Cake MH, Lukas MA, Knudsen J. Evaluation of the affinity and turnover number of both hepatic mitochondrial and microsomal carnitine acyltransferases: relevance to intracellular partitioning of acyl-CoAs. *Biochemistry* 1999, 38:15840-15847

<sup>132</sup> Gosset RE, Edmondson RD, Jolly CA, Cho TH, Russell DH, Knudsen J, Kier AB, Schroeder F. Structure and function of normal and transformed murine acyl-CoA binding proteins. *Arch Biochem Biophys* 1998, 350:201-213

<sup>133</sup> Abo-Hashema KAH, Cake MH, Lukas MA, Knudsen J. The interaction of acyl-CoA with acyl-CoA binding protein and carnitine palmitoyltransferase I. *Int J Biochem Cell Biol* 2001, 33:807-815

<sup>134</sup> Yang YY, Pritchard PH, Bhuiyan J, Seccombe DW, Moghadasian MH. Overexpression of acyl-coA binding protein and its effects on the flux of free fatty acids in McA-RH 7777 cells. *Lipids* 2001, 36:595-600

los ácidos grasos<sup>135</sup>, siendo crucial en el control de la  $\beta$ -oxidación. Se han descrito diversos reguladores de la CPT I, entre ellos el malonil-CoA, la acumulación de iones de hidrógeno en el sarcoplasma y la disponibilidad reducida de carnitina. Todos estos aspectos se tratan en la siguiente sección.

Además de la CPT I, recientemente se ha sugerido que la FAT/CD36 podría jugar también un papel importante en el transporte de ácidos grasos al interior de la mitocondria<sup>118,119</sup>. Se ha observado que la FAT/CD36 se encuentra en la membrana mitocondrial tanto en músculo de rata como humano y colocaliza con la CPT I. Además la inhibición de esta proteína mediante un inhibidor específico conlleva una inhibición de la  $\beta$ -oxidación sin afectar la oxidación de octanoato ni la actividad CPT I, acumulándose acil-carnitina. Por lo tanto, la función de esta proteína sería posiblemente la de ayudar a la CPT I al transporte de ácidos grasos actuando como una transportadora de acil-carnitina desde la CPT I a la CACT (figura 3). La presencia de FAT/CD36 en la membrana mitocondrial aumenta tras una estimulación eléctrica crónica (estimulación de la expresión de la proteína) o tras una estimulación eléctrica aguda (inducción de la translocación de la proteína a la membrana plasmática y mitocondrial) y con ello la oxidación de ácidos grasos<sup>118</sup>.

Otro punto de control que involucra al metabolismo mitocondrial de ácidos grasos es el paso catalizado por la  $\beta$ -cetoacil-CoA tiolasa, la enzima responsable de catalizar la reacción final de la  $\beta$ -oxidación: la rotura del  $\beta$ -cetoacil-CoA en acetil-CoA y acil-CoA. El acetil-CoA es un inhibidor de esta enzima y cuando se acumula, la tiolasa se inhibe y esto provoca una inhibición de la  $\beta$ -oxidación<sup>136</sup>. Por lo tanto las altas concentraciones de acetil-CoA, como las observadas durante el ejercicio<sup>137</sup>, o cuando los niveles de glucógeno son elevados<sup>138</sup>, pueden provocar una disminución de la  $\beta$ -oxidación mediante la inhibición de la  $\beta$ -cetoacil-CoA tiolasa.

---

<sup>135</sup> Awan MM, Saggerson ED. Malonyl-CoA metabolism in cardiac myocytes and its relevance to the control of fatty acid oxidation. *Biochem J* 1993, 295:61-66

<sup>136</sup> Liang X, Le W, Zhang D, Schulz H. Impact of the intramitochondrial enzyme organization of fatty acid oxidation. *Biochem Soc Trans* 2001, 29:279-282

<sup>137</sup> Constantin-Teodosiu D, Carlin JI, Cederblad G, Harris RC, Hultman E. Acetyl group accumulation and pyruvate dehydrogenase activity in human muscle during incremental exercise. *Acta Physiol Scand* 1991, 143:367-372

<sup>138</sup> Putman CT, Spriet LL, Hultman E, Lindinger MI, Lands LC, McKelvie RS, Cederblad G, Jones NL, Heigenhauser GJ. Pyruvate dehydrogenase activity and acetyl group accumulation during exercise after different diets. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1993, 265:E752-E760

#### 4. SISTEMA CARNITINA PALMITOILTRANSFERASA

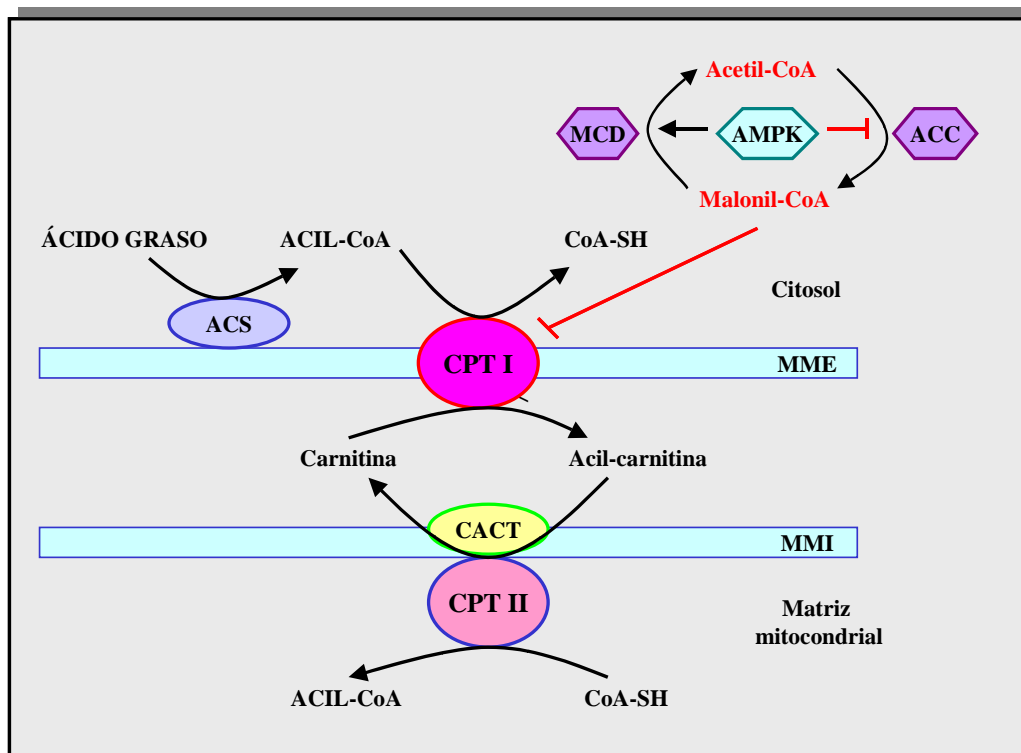
El transporte de ácidos grasos dentro de la mitocondria es llevado a cabo por el sistema carnitina palmitoiltransferasa (CPT). Este sistema se compone de tres proteínas<sup>139</sup>, CPT I, carnitina:acilcarnitina translocasa (CACT) y CPT II, cada una con una localización subcelular diferente. En un primer paso, los aciles-CoA formados por la acción de la LCAS en la membrana mitocondrial externa, son convertidos en acil-carnitina. Este paso está regulado por la carnitina palmitoiltransferasa I (CPT I), localizada en la membrana mitocondrial externa. El complejo acil-carnitina es transportado a la matriz mitocondrial en una reacción de intercambio facilitada por la CACT, una proteína integral de membrana mitocondrial interna. En la matriz mitocondrial, la acil-carnitina es reconvertida en acil-CoA por acción de la CPT II, localizada en la cara interna de la membrana mitocondrial interna. La carnitina que se libera difunde hacia el citoplasma y puede volver a ser utilizada por la CPT I (figura 4).

La CPT I está fuertemente regulada por su inhibidor fisiológico, el malonil-CoA, y por lo tanto es el paso más importante en el control de la oxidación de ácidos grasos. Esto convierte a CPT I en una potencial diana farmacológica para el tratamiento de desordenes metabólicos como enfermedades coronarias, resistencia a la insulina y diabetes<sup>140</sup>.

---

<sup>139</sup> Kerner J, Hoppel C. Fatty acid import into mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta* 2000, 1416:1-17

<sup>140</sup> Ruderman NB, Saha AK, Vavvas D, Witters LA. Malonyl-CoA, fuel sensing and insulin resistance. *Am J Physiol* 1999, 276:E1-E18



**Figura 4. Transporte de ácidos grasos dentro de la mitocondria mediante el sistema CPT.** Los ácidos grasos de cadena larga se activan a acil-CoA por acción de la acil-CoA sintetasa (ACS). El transporte del acil-CoA al interior de la mitocondria es llevado a cabo por la acción de la CPT I, que convierte el acil-CoA en acil-carnitina, la carnitina:acilcarnitina translocasa (CACT), que transporta la acil-carnitina a través de la membrana mitocondrial interna, y la CPT II que reconvierte la acil-carnitina en acil-CoA. Los niveles de malonil-CoA, inhibidor de la CPT I, están regulados por las actividades de la acetil-CoA carboxilasa (ACC) y malonil-CoA descarboxilasa (MCD). Estas dos proteínas están a su vez reguladas por la AMPK. MME: membrana mitocondrial externa; MMI: membrana mitocondrial interna.

Los mamíferos expresan dos isoformas de CPT I, la isoforma hepática (LCPT I)<sup>141,142</sup>, y la isoforma de músculo cardiaco y esquelético (MCPT I)<sup>143,144</sup>, las cuales son

<sup>141</sup> Esser V, Britton CH, Weis BC, Foster DW, McGarry JD. Cloning and sequencing and expression of a cDNA encoding rat liver carnitine palmitoyltransferase I. *J Biol Chem* 1993, 268:5817-5822

<sup>142</sup> Britton CH, Schultz RA, Zhang B, Esser V, Foster DW, McGarry JD. Human liver mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I: caracterization of its cDNA and chromosomal localization and partial analysis of the gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, 92:1984-1988

<sup>143</sup> Yamazaki N, Shinohara Y, Shima A, Terada H. High expresión of a novel carnitine palmitoyltransferase I like protein in rat brown adipose tissue and heart: isolation and characterization of its cDNA clone. *FEBS Lett* 1995, 363:41-45

<sup>144</sup> Yamazaki N, Shinohara Y, Shima A, Yamanaka Y, Terada H. Isolation and characterization of cDNA and genomic clones encoding human muscle type carnitine palmitoyltransferase I. *Biochimica and Biophysica Acta* 1996, 1307:157-161



el producto de dos genes diferentes. Los genes humanos para ambas proteínas están localizados en los cromosomas 11q13 (LCPT I) y 22q13.3 (MCPTI)<sup>145</sup>. LCPT I tiene 773 aminoácidos (88 kDa) y MCPT I 772 (88 kDa). La identidad entre la secuencia de aminoácidos es del 62%, pero su regulación por malonil-CoA es distinta. La isoforma muscular es mucho más sensible al malonil-CoA (la IC<sub>50</sub> es dos órdenes de magnitud menor para MCPT I)<sup>146</sup>. Esta propiedad, como se verá más adelante, está involucrada en la compleja regulación de la oxidación de ácidos grasos en músculo esquelético. Recientemente, se ha descubierto un nuevo miembro de la familia de las CPT I, la CPTIc, que se expresa principalmente en cerebro y testículos<sup>147</sup>. La secuencia aminoacídica de la proteína mantiene todos los residuos importantes para la actividad carnitina aciltransferasa y el dominio de unión a malonil-CoA. Sin embargo, la proteína sobreexpresada en levaduras no tiene actividad enzimática detectable con varios aciles-CoA, que son buenos sustratos para otras carnitina aciltransferasas. Se ha hipotetizado que esta isoforma podría jugar un papel importante en el metabolismo de una clase distinta de ácidos grasos involucrados en alguna función en el cerebro y/o en el control del apetito.

La distribución y las características cinéticas de las diferentes CPT se resumen en la siguiente tabla:

---

<sup>145</sup> Britton CH, Mackey DW, Esser V, Foster DW, Burns DK, Yarnall DP, Froguel P, McGarry JD. Fine chromosome mapping of the genes for human liver and muscle carnitine palmitoyltransferase I (CPT1A and CPT1B). *Genomics* 1997, 40:209-211

<sup>146</sup> Esser V, Brown NF, Cowan AT, Foster DW, McGarry JD. Expression of a cDNA isolated from rat brown adipose tissue and heart identifies the product as muscle isoform of carnitine palmitoyltransferase I (MCPTI). MCPT I is the predominant CPTI isoform expressed in both white (epididymal) and brown adipocytes. *J Biol Chem* 1996, 271:6972-6977

<sup>147</sup> Price NT, Van der Leij FR, Jackson VN, Corstorphine CG, Thomson R, Sorensen A, Zammit VA. A novel brain expressed protein related to carnitine palmitoyltransferase I. *Genomics* 2002, 80:433-442

	<b>LCPTI</b>	<b>MCPTI</b>	<b>CPTII</b>	<b>CPTIc</b>
<b>Tamaño</b>	88 kDa	88 kDa	70 kDa	88 kDa
<b>IC50 Malonil-CoA</b>	2,5 $\mu$ M	0,03 $\mu$ M	-	
<b>Km Carnitina</b>	30 $\mu$ M	500 $\mu$ M	120 $\mu$ M	
<b>Locus cromosoma humano</b>	11q13	22q13.3	1p32	19q13.33
<b><u>Expresión</u></b>				
<b>Hígado</b>	++++	-	+	
<b>Músculo esquelético</b>	(+)	++++	+	
<b>Corazón</b>	+	+++	+	
<b>Riñón</b>	++++	(+)	+	
<b>Pulmón</b>	++++	(+)	+	
<b>Bazo</b>	++++	-	+	
<b>Intestino</b>	++++	-	+	(+)
<b>Páncreas</b>	++++	-	+	
<b>Tejido adiposo marrón</b>	(+)	++++	+	
<b>Tejido adiposo blanco</b>	+	+++	+	
<b>Ovarios</b>	++++	(+)	+	(+)
<b>Testículos</b>	(+)	++++	+	(+)
<b>Fibroblastos humanos</b>	++++	-	+	
<b>Cerebro</b>				+
<b>Cerebelo</b>	-	++++	+	-
<b><u>Deficiencia humana descrita</u></b>	si	no	si	no

Tabla 1. Características cinéticas y distribución tisular de la diferentes isoformas de CPT I.

## 4.1. REGULACIÓN DE LA CPT I

### 4.1.1. Regulación a nivel transcripcional

En cuanto a la regulación a nivel de mRNA, se ha descrito que cambios en la ratio glucagón/insulina provocan cambios en los niveles del mRNA de la CPT I, que además están asociados con niveles elevados de ácidos grasos y disponibilidad reducida de glucosa<sup>148</sup>. Concentraciones fisiológicas de ácidos grasos inducen un rápido incremento de la expresión de LCPTI en hígado<sup>149</sup> y el metabolismo posterior a la formación del acil-CoA no está involucrado en este proceso.

<sup>148</sup> Park EA, Mynatt RL, Cook GD, Kashfi K. Insulin regulates enzyme activity, malonyl-CoA sensitivity and mRNA abundance of hepatic carnitine palmitoyltransferase I. *Biochem J* 1995, 310:853-858

<sup>149</sup> Chatelain F, Kohl C, Esser V, McGarry JD, Girard J, Pegorier JP. Cyclic AMP and fatty acids increase carnitine palmitoyltransferase I gene expression in cultured fetal rat hepatocytes. *Eur J Biochem* 1996, 235:789-798

Los efectos transcripcionales de los ácidos grasos sobre la expresión de CPT I pueden ser mediados por PPARs<sup>150</sup>, aunque este aspecto está siendo actualmente discutido<sup>151</sup>. Se han encontrado elementos de respuesta a estos factores de transcripción en regiones reguladoras de numerosos genes que codifican para enzimas involucrados en el metabolismo de lípidos<sup>152</sup>, incluyendo la CPT I<sup>153</sup>.

#### 4.1.2. Regulación por malonil-CoA

El malonil-CoA es el inhibidor fisiológico de la CPT I, y como tal es su principal regulador. Como se ha comentado anteriormente, la sensibilidad de LCPT I al malonil-CoA es mucho menor que la de MCPT I, indicando que la regulación será diferente en los tejidos donde se exprese una u otra isoforma.

Los niveles celulares de malonil-CoA son determinantes en la regulación de CPT I, por lo tanto, el control de estos niveles es también vital importancia. La formación de malonil-CoA está catalizada por la acetil-CoA carboxilasa (ACC), que se expresa en dos isoformas, ACC1 y ACC2. La primera se expresa predominantemente en tejidos lipogénicos como el hígado y el tejido adiposo, mientras que la segunda se expresa en corazón y músculo esquelético principalmente<sup>154</sup>. La ACC1 predomina en tejidos donde la LCPT I también predomina, y la ACC2 se expresa en tejidos donde principalmente se expresa la MCPT I. Además, la ACC2 presenta una extensión de su extremo amino terminal que le confiere la posibilidad de anclarse a la membrana mitocondrial externa, posiblemente cerca de la CPT I<sup>155</sup>. La actividad de la ACC está sujeta a un control agudo mediante rápidas modificaciones covalentes (inactivación y

---

<sup>150</sup> Gulick T, Cresci S, Caira T, Moore DD, Nelly DP. The peroxisome proliferator activated receptor regulates mitochondrial fatty acid oxidative enzyme gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91:11012-11016

<sup>151</sup> Louet J, Chatelain F, Decaux J, Park E, Kohl C, Pienau T, Girard J, Pegorier J. Long-chain fatty acids regulate liver carnitine palmitoyltransferase I gene expression through a peroxisome-proliferator-activated receptor alpha (PPAR alpha)-independent pathway. *Biochem J* 2001, 354: 189-197

<sup>152</sup> Latruffe N, Vamecq J. Peroxisome proliferators and peroxisome proliferator activated (PPARs) as regulators of lipid metabolism. *Biochimie* 1997, 79:81-84

<sup>153</sup> Mascaro C, Acosta E, Ortiz JA, Marrero PF, Hegardt FG, Haro D. Control of human muscle-type carnitine palmitoyltransferase I gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor. *J Biol Chem* 1998, 273:8560-8563

<sup>154</sup> Brownsey RW, Zhande R, Boone AN. Isoforms of acetyl-CoA carboxylase: structures, regulatory properties and metabolic functions. *Biochem Soc Trans* 1997, 25:1232-1238

<sup>155</sup> Abu-Elheiga L, Brinkley WR, Zhong L, Chirala SS, Wodergorgis G, Wakil SJ. The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97:1444-1449

activación por fosforilación y desfosforilación respectivamente), por una activación por citrato y por una inhibición por ácidos grasos<sup>156</sup>.

Además de la ACC, otra proteína juega un papel importante en el control de los niveles de malonil-CoA, la malonil-CoA descarboxilasa (MCD). Esta enzima descarboxila el malonil-CoA para producir acetil-CoA, reduciendo los niveles celulares de malonil-CoA. Cuando las necesidades energéticas son elevadas, la ACC se encuentra inhibida y la MCD activada, de modo que el efecto neto es una bajada de los niveles de malonil-CoA y con ello una activación de la oxidación de ácidos grasos.

#### 4.1.2.1. Pérdida de la sensibilidad al malonil-CoA: mutación de la metionina 593

Varios investigadores han tratado de establecer la base de la interacción entre el malonil-CoA y CPT I. Gracias a estudios que demostraron la dependencia del pH en la afinidad de CPT I por su sustrato y la incapacidad del palmitoil-CoA de desplazar el malonil-CoA unido a mitocondrias de músculo, se ha hipotetizado que el palmitoil-CoA y el malonil-CoA se unen a diferentes lugares de la proteína<sup>157</sup>. Varios estudios han demostrado que en la CPT I de hígado de rata existen dos lugares de unión a malonil-CoA: uno con gran capacidad de unión y regulación del inhibidor y sin competición apreciable con el acil-CoA, que se comporta como un componente alostérico<sup>158</sup>, y un segundo lugar de unión cercano al centro catalítico<sup>159</sup>.

Se ha demostrado que los extremos C y N-terminal de la proteína tienen influencia en la interacción enzima/inhibidor<sup>160,161</sup>. Otros estudios cinéticos han

---

<sup>156</sup> Alfred JB, Reilly KE. Short-term regulation of acetyl-CoA carboxylase in tissues of higher animals. *Prog Lipid Res* 1997, 35:371-385

<sup>157</sup> Mills SE, Foster DW, McGarry JD. Effects of pH on the interaction of substrates and malonyl-CoA with mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I. *Biochem J* 1984, 219:601-608

<sup>158</sup> Cook GA, Mynatt RL, Kashfi K. Yonetani-Theorell analysis of hepatic carnitine palmitoyltransferase I inhibition indicates two distinct inhibitory binding sites. *J Biol Chem* 1994, 269:8803,8807

<sup>159</sup> Grantham BD, Zammit VA. Binding of [14C]malonyl-CoA to rat liver mitochondria after blocking of the active site of carnitine palmitoyltransferase I. Displacement of low-affinity binding by palmitoyl-CoA. *Biochem J* 1986, 233:589-593

<sup>160</sup> Jackson VN, Zammit VA, Price NT. Identification of positive and negative determinants of malonyl-CoA sensitivity and carnitine affinity within the amino termini of rat liver- and muscle-type carnitine palmitoyltransferase I. *J Biol Chem* 2000, 275:38410-38416

<sup>161</sup> Shi J, Zhu H, Arvidson DN, Woldegiorgis G. The first 28 N-terminal amino acids residues of human heart muscle carnitine palmitoyltransferase I are essential for malonyl-CoA sensitivity and high-affinity binding. *Biochemistry* 2000, 39:712-717

propuesto que los dos dominios inhibibles por malonil-CoA podían estar localizados en el extremo C-terminal. El desarrollo de un modelo del centro catalítico de LCPT I<sup>162</sup> permitió a nuestro grupo de investigación asignar el sitio de unión de baja afinidad a un dominio cercano al canal catalítico donde se une el palmitoil-CoA<sup>163</sup>.

En un estudio reciente de nuestro grupo<sup>164</sup> se ha identificado la metionina 593 como el aminoácido de la LCPT I crítico para la sensibilidad al malonil-CoA. Este aminoácido está presente en todas las carnitina aciltransferasas inhibibles por malonil-CoA (LCPT I, MCPT I, y COT) de varios organismos y está ausente en las carnitina aciltransferasas no inhibibles por malonil-CoA (CPT II, CAT y colina acetiltransferasa (ChAT)). La mutación de este aminoácido por su equivalente en la CPT II, una serina, mostró que la mutación por sí misma, M593S, provocaba una pérdida casi total de la sensibilidad a malonil-CoA cuando este mutante se expresaba en levaduras. Es interesante destacar que este mutante presentó una eficiencia catalítica mayor hacia el palmitoil-CoA como sustrato que la forma no mutada. Así pues, probablemente, la presencia de una metionina en esta posición se haya conservado evolutivamente en las carnitina aciltransferasas inhibibles por malonil-CoA indicando su importancia en la sensibilidad a malonil-CoA.

En el presente estudio, se han sobreexpresado tanto la forma salvaje como la forma mutada M593S de la LCPT I en células de músculo esquelético para comprobar la hipótesis de que una  $\beta$ -oxidación aumentada revierte la resistencia a la insulina inducida por ácidos grasos.

#### 4.1.3. Regulación independiente de malonil-CoA

Además de la regulación por malonil-CoA, se han descrito otros mecanismos de regulación de CPT I independientes del malonil-CoA. Se ha sugerido, por ejemplo, que

---

<sup>162</sup> Morillas M, Gómez-Puertas P, Roca R, Serra D, Asins G, Valencia A, Hegardt FG. Structural model of the catalytic core of carnitine palmitoyltransferase I and carnitine octanoyltransferase (COT): mutation of CPT I histidine 473 and alanine 381 and COT alanine 238 impairs catalytic activity. *J Biol Chem* 2001, 276:45001-45008

<sup>163</sup> Morillas M, Gómez-Puertas P, Rubí B, Clotet J, Ariño J, Valencia A, Hegardt FG, Serra D, Asins G. Structural model of a malonyl-CoA-binding site of carnitine octanoyltransferase and carnitine palmitoyltransferase I: mutational analysis of a malonyl-CoA affinity domain. *J Biol Chem* 2002, 277:11473-11480

<sup>164</sup> Morillas M, Gómez-Puertas P, Bentebibel A, Selles E, Casals N, Valencia A, Hegardt FG, Asins G, Serra D. Identification of conserved aminoacids residues in rat liver carnitine palmitoyltransferase I critical for malonyl-CoA inhibition. Mutation of methionine 593 abolishes malonyl-CoA inhibition. *J Biol Chem* 2003, 278:9058-9063

la CPT I puede ser regulada por fosforilación<sup>165,166</sup>. Otro mecanismo propuesto involucra la interacción directa de CPT I con proteínas del citoesqueleto en la membrana mitocondrial externa<sup>167,168</sup>. Otros estudios aportan evidencias de una estimulación de CPT I por la AMPK, vía fosforilación de componentes del citoesqueleto<sup>169</sup>. En estos estudios se propone que la proteína quinasa II dependiente de  $Ca^{2+}$ /calmodulina y posiblemente la AMPK jueguen un papel central, no sólo activando la CPT I sino también fosforilando e inactivando la ACC, y por lo tanto reforzando la activación de la CPT I mediante la bajada de los niveles de malonil-CoA.

#### 4.1.4. Regulación farmacológica

La inhibición de la oxidación de ácidos grasos podría ser una buena estrategia para bajar los niveles de glucosa en sangre en animales diabéticos y en la diabetes de tipo 2 en general<sup>170</sup>.

El etomoxir es uno de los inhibidores de la CPT I más estudiados. Actúa como un inhibidor irreversible activo en hígado, músculo y corazón, y sólo es activo farmacológicamente una vez transformado a etomoxiril-CoA<sup>171</sup>. Tomado oralmente, el etomoxir es un inhibidor eficaz de CPT I en hígado y músculo proporcionando una actividad anticetogénica y hipoglucémica en animales modelo de diabetes de tipo 2. Se

---

<sup>165</sup> Guzmán M, Geelen MJH. Activity of carnitine palmitoyltransferase in mitochondrial outer membranes and peroxisomes in digitonin-permeabilized hepatocytes. *Biochem J* 1992, 287:487-492

<sup>166</sup> Kerner J, Distler AM, Minkler PE, Parland W, Peterman SM, Hoppel CL. Phosphorilation of rat liver mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I (CPT I): Effect on the kinetic properties of the enzyme. *J Biol Chem* 2004, 279:41104-41113

<sup>167</sup> Guzmán M, Velasco G, Geelen MJH. Do cytoskeletal components control fatty acid translocation into liver mitochondria? *Trend Endocrinol Metab* 2000, 11:49-53

<sup>168</sup> Velasco G, Geelen MJH, Gomez el Pulgar T, Guzmán M. Malonyl-CoA dependent acute control of hepatic carnitine palmitoyltransferase I activity. *J Biol Chem* 1998, 273:21497-21504

<sup>169</sup> Velasco G, Gomez del Pulgar T, Carling M, Guzmán M. Evidence that the AMP-activated protein kinase stimulates rat liver carnitine palmitoyltransferase I by phosphorylating cytoskeletal components. *FEBS Lett* 1998, 439:317-320

<sup>170</sup> Anderson RC. Carnitine palmitoyltransferase: a viable target for the treatment of NIDDM? *Curr Pharmacol Design* 1998, 4:1-15

<sup>171</sup> Weis BC, Cowan AT, Brown N, Foster DW, McGarry JD. Use of a selective inhibitor of liver carnitine palmitoyltransferase I (CPT I) allows quantification of its contribution to total CPT I activity in rat heart. Evidence that the dominant cardiac CPT I isoform is identical to the skeletal muscle enzyme. *J Biol Chem* 1994, 269:26443-26448

ha demostrado que mejora la sensibilidad a la insulina en pacientes diabéticos<sup>172</sup>. Sin embargo, el fármaco no ha sido desarrollado como un agente antidiabético debido a que causa hipertrofia en el corazón. Además, de momento, las estrategias usadas para la inhibición de la oxidación de ácidos grasos a nivel de la  $\beta$ -oxidación no han sido satisfactorias debido a toxicidades y hipoglucemias incontroladas.

Recientemente se ha propuesto un nuevo compuesto, el C75, como otro regulador farmacológico de la CPT I (ver sección 6).

## 4.2. REGULACIÓN DE CPT I EN MÚSCULO ESQUELÉTICO

Las particularidades metabólicas del músculo esquelético hacen que la regulación de CPT I sea algo más compleja que en otros tejidos. En músculo, tal y como se ha detallado anteriormente, se expresa la isoforma MCPT I, la cual, es dos órdenes de magnitud más sensible a malonil-CoA y tiene mucha menor afinidad por la carnitina que la LCPT I<sup>173</sup>. Las concentraciones de malonil-CoA presentes en músculo son de 1-10  $\mu\text{M}$ <sup>174</sup>, excediendo claramente el valor de  $\text{IC}_{50}$  para el malonil-CoA de MCPT I. Por lo tanto es difícil entender como la  $\beta$ -oxidación tiene lugar si la CPT I es el paso limitante. Se han especulado tres posibilidades por las cuales lo anterior podría ser cierto: 1) existe una actividad CPT I insensible a malonil-CoA en músculo, 2) la mayor parte del malonil-CoA determinado corresponde a malonil-CoA intramitocondrial o unido y por lo tanto no disponible para inhibir la CPT I, o 3) la CPT I no es el paso limitante de la  $\beta$ -oxidación en músculo esquelético.

Respecto a la primera posibilidad, se han encontrado dos formas de *splicing* alternativo de MCPT I (CPTIB-2, CPTIB-3) tanto en rata<sup>175</sup> como en humano<sup>176</sup>. CPT IB-2 no tiene el segundo dominio transmembrana con lo cual no está claro si puede insertarse en la membrana mitocondrial. A CPTIB-3 le faltan 34 aminoácidos en el

<sup>172</sup> Hubinger A, Weikert G, Wolf HP, Gries FA. The effect of etomoxir on insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *Horm Metab Res* 1992, 24:115-118

<sup>173</sup> Zammit VA. Carnitine acyltransferases: functional significance of subcellular distribution and membrane topology. *Prog Lipid Res* 1999, 38:199-224

<sup>174</sup> Goodwin GW, Ahmad F, Doenst T, Taegtmeier H. Energy provision from glycogen, glucose, and fatty acids on adrenergic stimulation of isolated working rat hearts. *Am J Physiol* 1998, 274:H1239-H1247

<sup>175</sup> Yu G, Lu Y, Gulick T. Rat carnitine palmitoyltransferase Ibeta mRNA splicing isoforms. *Biochimica and Biophysica Acta* 1998, 1393:166-172

<sup>176</sup> Yu G, Lu Y, Gulick T. Expression of novel isoforms of carnitine palmitoyltransferase I (CPT-1) generated by alternative splicing of the CPT-ibeta gene. *Biochem J* 1998,334:225-231

extremo N-terminal de la región catalítica y sus propiedades bioquímicas son desconocidas. Ambas isoformas mantienen el extremo C-terminal catalítico y los aminoácidos en el extremo N-terminal cruciales para la inhibición por malonil-CoA, pero las propiedades catalíticas y la sensibilidad al malonil-CoA no pueden ser predecidas, incluso aunque las proteínas se insertasen correctamente en la membrana mitocondrial externa. Sin embargo se ha sugerido que estas dos variantes de *splicing* son insensibles al malonil-CoA permitiendo que la  $\beta$ -oxidación tenga lugar incluso en presencia de concentraciones significativas de malonil-CoA. A pesar de todo esto, la importancia fisiológica de las nuevas variantes de MCPT I todavía debe demostrarse.

En cuanto a la segunda posibilidad, es preciso comentar que contrariamente a lo que ocurre en hígado, donde el malonil-CoA es sustrato para la síntesis de ácidos grasos, en músculo este proceso no es importante<sup>177</sup>. Por esta razón, en músculo, el malonil-CoA actúa como un sensor energético, y su principal papel es regular la oxidación de ácidos grasos<sup>140</sup>. Además, su concentración está regulada por la actividad relativa de la ACC2 y la MCD, ambas reguladas por la AMPK (figura 4). La AMPK se ha propuesto también como parte de la maquinaria celular que detecta los niveles energéticos<sup>178</sup>. Bajo condiciones de estrés, como hipoxia o ejercicio, la caída en la ratio ATP/AMP provoca una fosforilación y activación de la AMPK, y esta a su vez fosforila e inactiva la ACC<sup>179</sup> y activa la MCD<sup>180</sup>. El resultado neto es una rápida disminución de los niveles de malonil-CoA y una capacidad aumentada de oxidar ácidos grasos. Como la ACC2 se encuentra localizada próxima a la CPT I, los cambios en malonil-CoA serán de una magnitud mucho mayor en las proximidades de la CPT I que no aquellos determinados en homogenados totales de tejido. Todo esto viene apoyado por la observación que durante el ejercicio los niveles de malonil-CoA en roedores bajan<sup>181</sup>. Sin embargo esto no ocurre en humanos. Estudios realizados en humanos han

---

<sup>177</sup> Hamilton C, Saggerson ED. Malonyl-CoA metabolism in cardiac myocytes. *Biochem J* 2000, 350:61-67

<sup>178</sup> Hardie DG, Carling D, Carlson M. The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu Rev Biochem* 1998, 67:821-855

<sup>179</sup> Winder WW, Hardie DG. Inactivation of acetyl-CoA carboxylase and activation of AMP-activated protein kinase in muscle during exercise. *Am J Physiol* 1996, 270:E299-E304

<sup>180</sup> Saha AK, Schwarsin AJ, Roduit R, Mece F, Kaushik V, Tornheim K, Prentki M, Ruderman NB. Activation of malonyl-CoA decarboxylase in rat skeletal muscle by contraction and the AMP-activated protein kinase activator 5-aminoimidazole-4-carboxamida-1-beta-D-ribofuranoside. *J Biol Chem* 2000, 275:24279-24283

<sup>181</sup> Winder WW, Arogyasami J, Barton RJ. Muscle malonyl-CoA decreases during exercise. *J Appl Physiol* 1989, 67:2230-2233



demostrado que durante el ejercicio, aún cuando la oxidación de ácidos grasos ha aumentado varias veces, los niveles de malonil-CoA no varían significativamente<sup>182</sup>. Este estudio sugiere que en humanos, no es necesaria una disminución de los niveles de malonil-CoA para activar la oxidación de ácidos grasos en músculo durante el ejercicio. Es posible entender esto si tenemos en cuenta que los métodos utilizados para medir la concentración de malonil-CoA no reflejan las concentraciones locales cercanas a la CPT I. Así, sería posible, que fuera este malonil-CoA cercano a CPT I el responsable de su regulación, y este efecto no se viera debido a los métodos de determinación del malonil-CoA. En conclusión, la CPT I estaría activa a las concentraciones de malonil-CoA presentes en músculo porque éste estaría secuestrado por una proteína cuando hay una necesidad de oxidar ácidos grasos, o porque el malonil-CoA involucrado en la regulación de CPT I sería el malonil-CoA producido en las proximidades de la CPTI por la ACC2 y sometido a una fuerte regulación.

Además del malonil-CoA, la CPT I está regulada por la acumulación de iones de hidrógeno. Se ha descrito que cambios en el pH de 7,0 a 6,8 inhiben la CPT I un 40%<sup>183</sup>. Esta relación entre el pH y CPT I tiene sentido, ya que bajo un ejercicio de alta intensidad la subida en los niveles de lactato son suficientes para bajar el pH y inhibir la  $\beta$ -oxidación<sup>184</sup>.

Otro posible modulador de la actividad CPT I son los niveles de carnitina. La carnitina es sustrato para la CPT I y por lo tanto es necesaria para el transporte de ácidos grasos al interior de la mitocondria. Por esta razón la carnitina juega también un papel importante en la regulación de la oxidación de lípidos. En reposo, la oxidación de ácidos grasos no está limitada por la carnitina<sup>185</sup>, sin embargo, durante el ejercicio su papel regulador es más importante. La carnitina puede ser acetilada por el acetyl-CoA formando acetyl-carnitina. Bajo situaciones en la que la intensidad de ejercicio va aumentando, la formación de acetyl-CoA a partir de piruvato excede la capacidad del

---

<sup>182</sup> Odland LM, Higenhauser GJF, Lopaschuck GD, Spriet LL. Human skeletal muscle malonil-CoA at rest and during prolonged submaximal exercise. *Am J Physiol* 1996, 270:E541-544

<sup>183</sup> Starrit EC, Howlett RA, Heigenbauser GJ, Spriet LL. Sensitivity of CPT I to malonyl-CoA in trained and untrained human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000, 278:E462-E468

<sup>184</sup> Sahlin K. Intracellular pH and energy metabolism in skeletal muscle of man. With special reference to exercise. *Acta Physiol Scand* 1978, 455(Suppl.):1-56

<sup>185</sup> Roepstorff C, Halberg N, Hilling T, Saha AK, Ruderman NB, Wojtaszewski JF, Richter EA, Kiens B. Malonyl-CoA and carnitine in regulation of fat oxidation in human skeletal muscle during exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004, 287:E696-E705

ciclo de Krebs para utilizarlo, acumulándose acetil-CoA. Para restaurar los niveles de CoA-SH libre, los acetiles se unen a la carnitina formándose acetil-carnitina, disminuyendo los niveles de carnitina libre y por lo tanto la actividad CPT I<sup>186</sup>. De acuerdo con esto, durante un aumento de la intensidad del ejercicio se observa una disminución de la oxidación de ácidos grasos acompañada con un aumento de los niveles de acetil-carnitina y una disminución de los niveles de carnitina libre.

En cuanto a la tercera posibilidad, existen otros potenciales mecanismos de regulación de la  $\beta$ -oxidación en músculo no relacionado con CPT I, como por ejemplo el paso catalizado por la  $\beta$ -cetoacil-CoA tiolasa o la reciente implicación de la FAT/CD36 en el transporte de ácidos grasos a la mitocondria (ver sección 3.2.5.).

En conclusión, debido a las complejidades metabólicas del músculo esquelético, así como a su necesidad de adaptarse rápidamente a situaciones de ejercicio de diferente intensidad, la regulación de la oxidación de ácidos grasos, y por lo tanto de la CPT I, es más compleja que la observada en otros tejidos.

## **5. DESREGULACIÓN DEL METABOLISMO DE ÁCIDOS GRASOS EN MÚSCULO Y RESISTENCIA A LA INSULINA**

Tal y como se ha descrito anteriormente la acumulación de lípidos dentro de la célula muscular está directamente correlacionado con la resistencia a la insulina. Sin embargo, el mecanismo por el cual esto sucede no es del todo conocido. Un punto clave es elucidar si la acumulación de lípidos en músculo de individuos resistentes a la insulina es consecuencia de un defecto primario en la oxidación de ácidos grasos o de un flujo aumentado de ácidos grasos al músculo, o es debida a una desregulación del balance entre la captación, esterificación y oxidación de los ácidos grasos. En conjunto, características del músculo como la capacidad de transporte de ácidos grasos, el potencial para la  $\beta$ -oxidación, la capacidad oxidativa, el grado de capilarización y el flujo sanguíneo hacia el músculo pueden estar dirigidas hacia una acumulación de lípidos en lugar de hacia una oxidación en individuos con resistencia a la insulina o diabetes de tipo 2.

---

<sup>186</sup> Hiatt WR, Regensteiner JG, Wolfel EE, Ruff L, Brass EP. Carnitine and acylcarnitine metabolism during exercise in humans. Dependence on skeletal muscle metabolic state. *J Clin Invest* 1989, 84:1167-1173

Las concentraciones plasmáticas de ácidos grasos juegan un papel importante en la captación de éstos por el músculo esquelético. Sin embargo, esta disponibilidad de ácidos grasos en plasma no es el único factor determinante en su captación. Como se ha comentado anteriormente, las proteínas transportadoras (FABPpm, FAT/CD36) son también importantes en la regulación del transporte de ácidos grasos en el músculo. En este sentido, se ha descrito un incremento de aproximadamente 4 veces en el contenido de FAT/CD36 y con ello del transporte de ácidos grasos en vesículas sarcolemales preparadas de músculo *rectus abdominis* de individuos obesos y diabéticos comparado con individuos control<sup>187</sup>, sugiriendo que el transporte de ácidos grasos al músculo está aumentado en obesidad y diabetes de tipo 2. Esta hipótesis se ve reforzada por el hecho que la deficiencia en FAT/CD36<sup>188</sup> o FATP1<sup>189</sup> protege de la resistencia a la insulina inducida por ácidos grasos.

Además de un aumento en el transporte de ácidos grasos, se ha observado una menor oxidación de éstos en pacientes diabéticos y obesos<sup>190</sup>. En este sentido, la CPT I adquiere un papel importante. Así, en músculo esquelético de paciente diabéticos y obesos<sup>191</sup> y en biopsias de músculo de individuos obesos<sup>192</sup> la actividad CPT I se encuentra reducida. Además, en modelos animales de obesidad y resistencia a la insulina se ha observado un aumento en los niveles de malonil-CoA, que inhiben la CPT I y provocan una disminución de la oxidación de lípidos<sup>193</sup>.

Otros estudios realizados a partir de células de músculo en cultivo obtenidas de individuos diabéticos, identificaron una reducción primaria de la oxidación de ácidos

---

<sup>187</sup> Bonen A, Parolin ML, Steinberg GR, Calles-Escandon J, Tandon NN, Glatz JF, Luiken JK, Heigenhauser GJ, Dyck DJ. 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* 2004, 18:1144-1146

<sup>188</sup> Hajri T, Han XX, Bonen A, Abumrad NA. Defective fatty acid uptake modulates insulin responsiveness and metabolic responses to diet in CD36-null mice. *J Clin Invest* 2002, 109:1381-1389

<sup>189</sup> Kim JK, Gimeno RE, Higashimori T. Inactivation of fatty acid transport protein 1 prevents fat-induced insulin resistance in skeletal muscle. *J Clin Invest* 2004, 113:756-763

<sup>190</sup> Blaak EE, Wagenmakers AJ, Glatz JF, Wolffenbuttel BH, Kemerink GJ, Heidendal GA, Saris WH. Plasma FFA utilization and fatty acid-binding protein content are diminished in type 2 diabetic muscle. *Am J Physiol* 2000, 279:E146-E154

<sup>191</sup> Simoneau JA, Veerkamp JH, Turcotte LP, Kelley DE. Markers of capacity to utilize fatty acids in human skeletal muscle: relation to insulin resistance and obesity and effects of weight loss. *FASEB J* 1999, 13:2051-2060

<sup>192</sup> Kim JY, Hickner RC, Cortright RL, Dohm GL, Houmard JA. Lipid oxidation is reduced in obese human skeletal muscle. *Am J Physiol* 2000, 279:E1039-E1044

<sup>193</sup> Saha AK, Vavvas D, Kurowski TG, Apazidis A, Witters LA, Shafir E, Ruderman NB. Malonyl-CoA regulation in skeletal muscle: its link to cell citrate and the glucose-fatty acid cycle. *Am J Physiol* 1997, 272:E641-E648

grasos, con un aumento de su esterificación a fosfolípidos, sin un aumento en su captación<sup>194</sup>. Estos datos sugieren que una oxidación de lípidos reducida, y no una captación de ácidos grasos descontrolada, es un factor primario (posiblemente genéticamente determinado) en la etiología de la diabetes.

Otro aspecto importante relacionado con la acumulación de lípidos en músculo es el concepto de inflexibilidad metabólica del músculo, descrito por Kelley y colaboradores<sup>195</sup>. En condiciones normales, el músculo, como se ha comentado anteriormente, utiliza ácidos grasos como sustrato energético en condiciones de ayuno, acompañado por un incremento en su captación, y tras una estimulación por insulina cambia rápidamente a utilizar glucosa, aumentando su transporte, oxidación y almacenamiento, con una inhibición de la oxidación de lípidos. Es decir, el músculo presenta una flexibilidad metabólica que le permite cambiar de un metabolismo de lípidos a uno de carbohidratos de forma rápida. En un estado de resistencia a la insulina, esta flexibilidad metabólica se pierde, y el músculo presenta una oxidación de lípidos elevada tras la estimulación por insulina, y una oxidación disminuida en condiciones de ayuno. Esta oxidación de ácidos grasos disminuida en situaciones de ayuno es probablemente un mecanismo clave en la acumulación de lípidos en el músculo.

Por último, otro posible factor determinante de una acumulación de lípidos en músculo, y relacionado con una pérdida su capacidad oxidativa, es el contenido y la función mitocondrial. Tanto el tamaño como la actividad de la cadena de transporte electrónica de las mitocondrias intermiofibrilares<sup>196</sup> y subsarcolemales<sup>197</sup> se encuentra disminuida en individuos diabéticos. Dada la importancia de las mitocondrias subsarcolemales (localizadas próximas a la membrana plasmática) en la transducción de señal, la oxidación de ácidos grasos y el transporte de sustratos, una reducción de su función puede tener una relevancia vital en la patogénesis de la resistencia a la insulina. Recientes estudios realizados a cabo mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear en humanos, sugieren que defectos más sutiles en la función mitocondrial están

---

<sup>194</sup> Gaster M, Rustan AC, Ass V, Beck-Nielsen H. Reduced lipid oxidation in skeletal muscle from type 2 diabetic subjects may be of genetic origin: evidence from cultured myotubes. *Diabetes* 2004, 53:542-548

<sup>195</sup> Kelley DE, Goodpaster BH, Wing RR, Simoneau JA. Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity and weight loss. *Am J Physiol* 1999, 277:E1130-E1141

<sup>196</sup> Kelley DE, He J, Meshikova EV, Ritov VB. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* 2002, 51:2944-2950

<sup>197</sup> Ritov VB, Meshikova EV, He J, Kelley DE. Deficiency of subsarcolemmal mitochondria in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes* 2005, 54:8-14

involucrados en este proceso. Así, Petersen y colaboradores<sup>198</sup> demostraron que en individuos ancianos sanos había una severa resistencia a la insulina acompañada por una disminución en la actividad oxidativa y la síntesis de ATP mitocondrial. Además, en descendientes resistentes a la insulina de individuos diabéticos la resistencia a la insulina está asociada con una desregulación del metabolismo de ácidos grasos intramiocelulares, debido también a una disfunción mitocondrial<sup>199</sup>.

Uno de los factores importantes en la disminución del contenido en mitocondrias podría ser la disminución de la expresión de genes que regulan la biogénesis mitocondrial. Estudios realizados con *micro-arrays* han demostrado una expresión disminuida de PGC-1 $\alpha$  (*peroxisome proliferator-activated co-activator 1 $\alpha$* ) en obesos con intolerancia a la glucosa y diabetes de tipo 2<sup>200</sup>. Por otro lado, se ha sugerido que la reducción en la función mitocondrial puede ser más que un defecto primario, una lesión secundaria ocasionada por una acumulación de lípidos y peróxidos lipídicos dentro de la mitocondria que inducirían el daño mitocondrial<sup>201</sup>.

En conclusión, los mecanismos que conllevarían a una acumulación de lípidos en músculo podrían incluir: 1) un fallo primario en la oxidación de los ácidos grasos, ya sea debido a un defecto en alguno de los enzimas involucrados en la oxidación, como la CPT I, o debido a una disminución del número o capacidad oxidativa de las mitocondrias, 2) una desregulación de la captación de lípidos en el músculo, conllevando a su acumulación dentro de la célula, o 3) ambos.

---

<sup>198</sup> Petersen KF, Befroy D, Dufour S, Shulman GI. Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. *Science* 2003, 300:1140-1142

<sup>199</sup> Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Shulman GI. Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N Eng J Med* 2004, 350:664-671

<sup>200</sup> Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF. PGC-1 $\alpha$  responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nature Genetics* 2003, 34:267-273

<sup>201</sup> Schrauwen P, Hesselink MK. Oxidative capacity, lipotoxicity, and mitochondrial damage in type 2 diabetes. *Diabetes* 2004, 53:1412-1417

## 6. C75, EL INHIBIDOR DE LA ÁCIDO GRASO SINTASA

El C75 es un inhibidor sintético y químicamente estable de la ácido graso sintasa (FAS), la enzima encargada de la síntesis de ácidos grasos. El C75 es un derivado de la cerulenina, otro inhibidor de la FAS obtenido de forma natural del hongo *Cephalosporium caerulens*, que se une irreversiblemente al centro catalítico de la FAS de tipo I (FAS de mamíferos y levaduras) y de tipo II (FAS de bacterias) mediante una modificación covalente de la proteína sintasa transportadora de  $\beta$ -ceto-aciles<sup>202,203</sup>. Estructuralmente, el C75 es una  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -butirolactona y ha sido diseñado para ser menos reactivo y por lo tanto más seguro que la cerulenina. No tiene el epóxido presente en la cerulenina, con lo cual su estabilidad química y su especificidad aumentan, permitiendo su uso como fármaco (ver figura 5). Del mismo modo que la cerulenina, que inhibe irreversiblemente la FAS formando un enlace covalente con la proteína, el C75 se comporta como un inhibidor irreversible de unión covalente<sup>204</sup>.

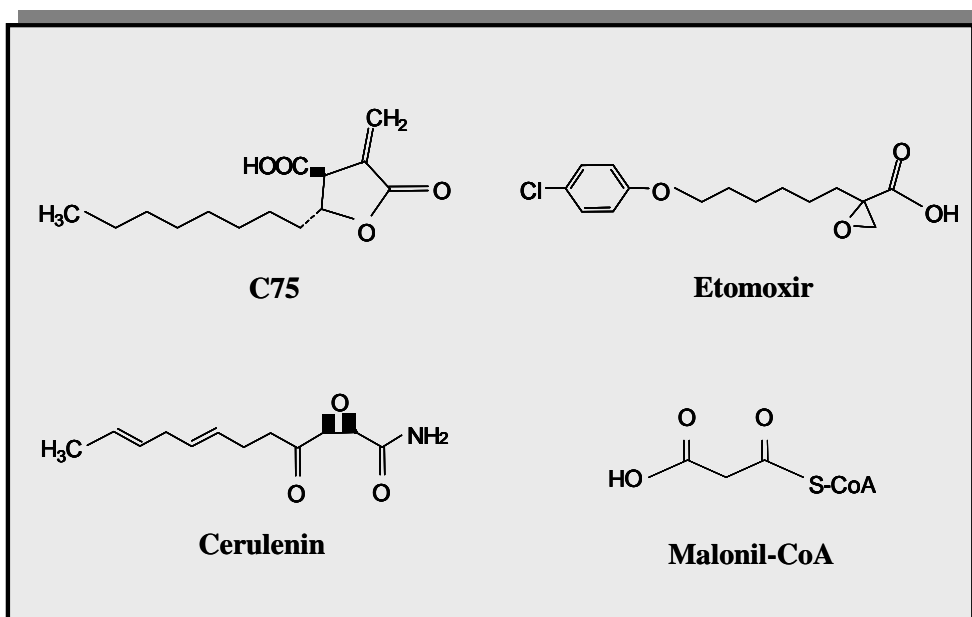


Figura 5. Estructuras químicas del C75, cerulenina, etomoxir y malonil-CoA.

<sup>202</sup> Moche M, Schneider G, Edwards P, Dehesh K, Lindqvist Y. Structure of the complex between the antibiotic cerulenin and its target,  $\beta$ -keto-acyl carrier protein synthase. *J Biol Chem* 1999, 274:6031-6034

<sup>203</sup> Price AC, Choi KH, Heath RJ, Li Z, White SW, Rock CO. Inhibition of  $\beta$ -keto-acyl carrier protein synthases by thiolactomycin and cerulenin. *J Biol Chem* 2001, 276:6551-6559

<sup>204</sup> Kuhajda FP, Pizer ES, Li JN, Mani NS, Frehywot GL, Townsend CA. Synthesis and antitumour activity of an inhibitor of fatty acid synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97:3450-3454

## 6.1. EL C75 COMO AGENTE ANTITUMORAL

La FAS es la única enzima responsable de la síntesis *de novo* de ácidos grasos a partir malonil-CoA y acetil-CoA, provenientes del metabolismo de carbohidratos. El mecanismo por el cual dos unidades de carbono del malonil-CoA se adicionan secuencialmente a la cadena creciente del ácido graso es único entre los vertebrados, convirtiendo a la FAS en una diana atractiva para el diseño de agentes terapéuticos. De hecho, una actividad elevada de FAS y una síntesis de ácidos grasos aumentada son dos alteraciones frecuentes presentes en varios cánceres humanos, incluyendo carcinomas de pecho, próstata, ovario, colon, pulmones, estómago, piel y endometrio<sup>205</sup>. Esta diferente expresión de FAS entre tejidos normales y cáncer ha llevado a la noción que la FAS puede ser una diana para el tratamiento del cáncer.

De esta manera, el C75 se diseñó como una droga antitumoral capaz de inhibir a la FAS y se comprobó *in vivo* en xenotransplantes de cánceres humanos. Este tratamiento produjo una potente y rápida inhibición de la replicación de DNA y de la progresión a la fase S del ciclo celular, conduciendo a apoptosis<sup>206</sup>. El TOFA, 5-(tetradeciloxi)-2-ácido furoico, un inhibidor competitivo de la ACC, una enzima implicada en la síntesis de ácidos grasos, inhibe drásticamente la síntesis de ácidos grasos, pero no es tóxico para células de cáncer humano en cultivo<sup>207</sup>. Además, el tratamiento de células de cáncer con TOFA antes de la administración de C75 rescata a las células del efecto citotóxico y previene los incrementos en los niveles de malonil-CoA inducidos por el C75<sup>207</sup>. Así, como el C75 bloquea a la FAS y los niveles de malonil-CoA aumentan y desencadenan la apoptosis, mientras que el TOFA bloquea los incrementos en los niveles de malonil-CoA inducidos por el C75, protegiendo a las células de la apoptosis, esto sugiere que son los niveles de malonil-CoA incrementados los responsables de la señal proapoptótica. Además de los efectos citotóxicos descritos,

---

<sup>205</sup> Kuhajda FP. Fatty-acid synthase and human cancer: new perspectives on its role in tumor biology. *Nutrition* 2000, 16:202-208

<sup>206</sup> Pizer ES, Chest FJ, DiGiusseppe JA, Han WF. Pharmacological inhibitors of mammalian fatty acid synthase suppress DNA replication and induce apoptosis in tumor cell lines. *Cancer Res* 1998, 58:4611-4615

<sup>207</sup> Pizer ES, Thupari J, Han WF, Pinn ML, Chrest FJ, Frehywot GL, Townsend CA, Kuhajda FP. Malonyl-CoA is a potential mediator of cytotoxicity induced by fatty acid synthase inhibition in human breast cancer cells and xenografts. *Cancer Res* 2000, 60:213-218

el C75 tiene también efectos citoestáticos, que cursan a través de la depleción de ácidos grasos en las células tumorales<sup>208</sup>.

## 6.2. EFECTO CENTRAL DEL C75

Recientemente se ha descubierto otra propiedad muy interesante del C75, en relación al tratamiento de la obesidad y la diabetes de tipo 2. Loftus y colaboradores<sup>209</sup> demostraron que el tratamiento sistémico e intracerebroventricular (ICV) con C75 conducía a una inhibición del apetito y a una dramática pérdida de peso en ratones delgados, obesos inducidos por una dieta grasa y deficientes en leptina. Esta acción era independiente de la leptina, ya que el C75 causaba pérdida de peso en ratones deficientes en leptina. Los ratones delgados, sin embargo, se volvieron resistentes al C75 tras unos días con el tratamiento y exhibieron una hiperfagia después el tratamiento. Los ratones obesos, en cambio, mostraron una tolerancia incipiente al C75, la cual sólo fue evidente tras la pérdida de peso.

Evidencias recientes<sup>210,211</sup> han implicado al malonil-CoA como el mediador de la vía hipotalámica que indica el estado energético y media el comportamiento de la ingesta en ratón. Así, el C75, aumentando los niveles de malonil-CoA, altera el metabolismo de las neuronas del hipotálamo responsables de la regulación de la ingesta. Además, el TOFA restaura la ingesta de comida a valores normales en ratones tratados con C75, apoyando la hipótesis de que el malonil-CoA media la inhibición de la ingesta. Este efecto del malonil-CoA podría cursar a través de la inhibición de la CPT I, y por lo tanto de la oxidación de ácidos grasos, haciendo que se acumularan y creando una señal de disponibilidad de nutrientes aumentada, llevando a señales de inhibición de la ingesta. Esta posibilidad viene apoyada por el uso de inhibidores de la CPT I en el

---

<sup>208</sup> Li JN, Gorospe M, Chrest FJ, Kumaravel TS, Evans MK, Han WF, Pizer ES. Pharmacological inhibition of fatty acid synthase activity produces both cytostatic and cytotoxic effects modulated by p53. *Cancer Res* 2001, 61:1493-1499

<sup>209</sup> Loftus TM, Jaworsky DE, Freynord GL, Townsend CA, Ronet GV, Lane MD, Kuhajda FP. Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. *Science* 2000, 288:2379-2381

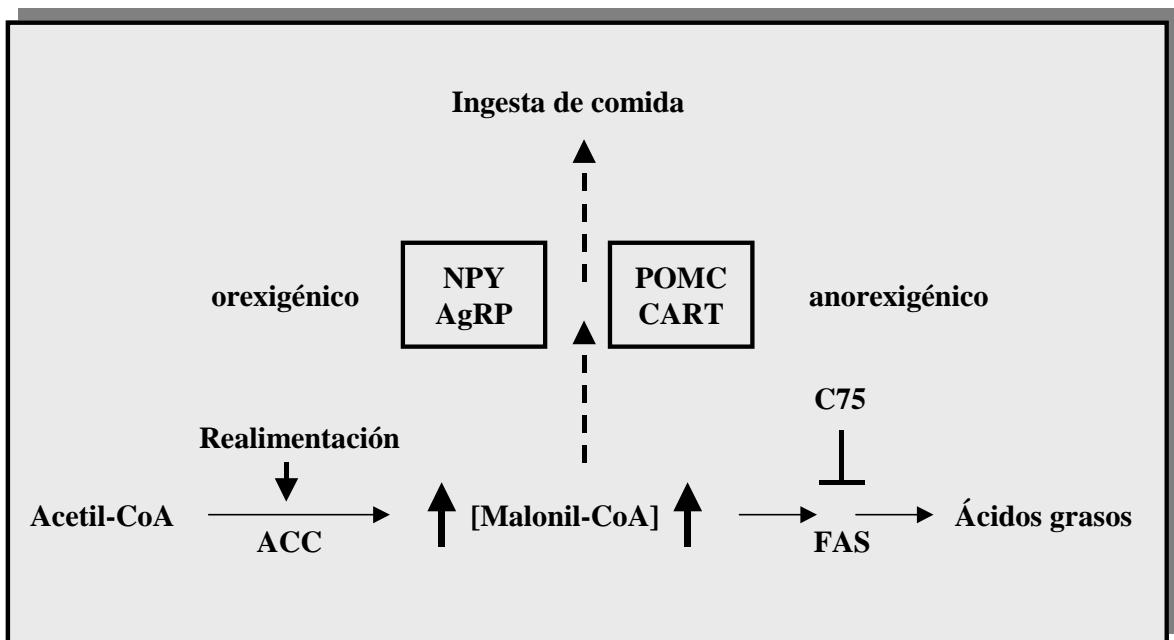
<sup>210</sup> Gao S, Lane D. Effect of the anorectic fatty acid synthase inhibitor C75 on neuronal activity in the hypothalamus and brainstem. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, 100:5628-5633

<sup>211</sup> Hu Z, Cha SH, Chohnan S, Lane MD. Hypothalamic malonyl-CoA as a mediator of feeding behaviour. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, 100:12624-12629



hipotálamo, que provocan una disminución de la ingesta<sup>212</sup>. Sin embargo no se ha demostrado que la inhibición de la CPT I tenga ningún efecto en la pérdida de peso, sugiriendo que otras acciones deben de contribuir a los efectos del C75.

El hipotálamo es el responsable de monitorizar el balance energético, que responde a señales periféricas promoviendo la liberación de neuropéptidos que regulan la ingesta y el gasto de energía. La restricción en la ingesta de comida conduce a una expresión incrementada de neuropéptidos orexigénicos, como el neuropéptido Y (NPY), y la AgRP (*agouti-related protein*), y a una expresión disminuida de péptidos anorexigénicos, como la proopiomelanocortina (POMC), y el transcrito regulado por cocaína-anfetamina (CART). En conjunto, estos cambios provocan un aumento en la ingesta de comida y un menor gasto de energía. Cuando animales en ayuno son realimentados, ocurre lo contrario (figura 6).



**Figura 6. Modelo del papel del malonil-CoA como mediador hipotalámico de la expresión de los neuropéptidos orexigénicos y anorexigénicos y la ingesta de comida.** Figura obtenida de<sup>207</sup>.

<sup>212</sup> Obici S, Feng Z, Arduini A, Conti R, Rossetti L. Inhibition of hypothalamic carnitine palmitoyltransferase 1 decreases food intake and glucose production. *Nat Med* 2003, 9:756-761

La administración ICV del C75 provoca un aumento de los niveles de malonil-CoA en el hipotálamo, causados por la inhibición de la FAS, y bloquea la expresión inducida por el ayuno del NPY, reduciendo como consecuencia la ingesta de comida<sup>209</sup>. Además, parece que el C75 ejerce sus efectos a corto y largo plazo en la ingesta de comida previniendo la sobreexpresión de los neuropéptidos orexigénicos y la disminución en la expresión de los neuropéptidos anorexigénicos<sup>213,214</sup>. Datos recientes sugieren que la modulación de la FAS por C75 en el hipotálamo puede alterar la percepción del estado energético reduciendo la actividad AMPK, que actúa como un sensor energético fisiológico en el hipotálamo<sup>215</sup>.

### 6.3. EFECTO PERIFÉRICO DEL C75

Además de sus acciones hipotalámicas, se ha descrito que el C75 reduce la acumulación de grasa en hígado y tejido adiposo de ratones obesos inducidos por dieta (ratones DIO)<sup>209</sup>. Lo interesante de esta observación es cómo puede haber una reducción de los niveles de grasa en tejidos periféricos en una situación donde los niveles de malonil-CoA están aumentados como resultado de la inhibición de la FAS por el C75. Esta paradoja se ha investigado en una serie de experimentos que hipotetizan que el C75 puede tener efectos adicionales sobre la actividad CPT I y por lo tanto sobre la oxidación de ácidos grasos.

En ratones DIO se ha observado un aumento del gasto de energía y de la oxidación de ácidos grasos tras la administración de C75, mientras que la administración de etomoxir, un potente inhibidor de la CPT I, revierte este incremento en la producción de energía y la pérdida de peso inducida por el C75<sup>216</sup>. Además el tratamiento de adipocitos, hepatocitos y células de cáncer de mama con C75 produjo un aumento en la actividad de la CPT I y en la oxidación de ácidos grasos, incluso en presencia de concentraciones elevadas de malonil-CoA. En otros estudios se ha

---

<sup>213</sup> Shimokawa T, Kumar MV, Lane MD. Effect of fatty acid synthase inhibitor on food intake and expression of hypothalamic neuropeptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99:66-71

<sup>214</sup> Cha SH, Hu Z, Lane MD. Long-term effects of a fatty acid synthase inhibitor on obese mice: food intake, hypothalamic neuropeptides, and UCP3. *BBRC* 2004, 317:301-308

<sup>215</sup> Kim EK, Miller I, Aja S, Landree LE, Pinn M, McFadden J, Kuhajda FP, Moran TH, Ronnett GV. C75, a fatty acid synthase inhibitor, reduces food intake via hypothalamic AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 2004, 279:19970-19976

<sup>216</sup> Thupari JN, Landree LE, Ronnet GV, Kuhajda FP. C75 increases peripheral energy utilization and fatty acid oxidation in diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99:9498-9502

observado que el C75 también activa la CPT I sobreexpresada en levaduras sin desplazar al malonil-CoA unido<sup>217</sup>. Estos resultados sugieren un mecanismo de acción dual para el C75. Por un lado el C75 tiene una acción central sobre el hipotálamo donde inhibe la FAS y incrementa los niveles de malonil-CoA, alterando la expresión de neuropéptidos que conducen a una disminución de la ingesta. Por otro lado, también actúa sobre tejidos periféricos activando la CPT I y la oxidación de ácidos grasos llevando a una disminución de la masa grasa del tejido adiposo y del hígado, ayudando a la pérdida de peso. Por lo tanto, estos datos describen por primera vez un fármaco capaz de activar la CPT I y identifican a esta enzima como una posible diana terapéutica para el tratamiento de la obesidad y la diabetes de tipo 2.

La naturaleza anfipática del C75 puede tener importancia en la estimulación de la CPT I ya que el palmitoil-CoA, el sustrato de la CPT I, es también una molécula anfipática, activa a la CPT I y en exceso puede revertir la inhibición por malonil-CoA<sup>218</sup> (figura 5). La cerulenina, inhibidor de origen natural de la FAS, tiene un único grupo dicarboxílico en su forma cíclica, no es anfipática, y al contrario que el C75, se ha descrito que inhibe la actividad CPT I<sup>219,220</sup>. En el primer caso<sup>219</sup>, la disminución de la actividad CPT I se ha correlacionado con una reducción de la oxidación de ácidos grasos y un incremento en la citotoxicidad en células de cáncer de mama humano tratadas con cerulenina. En el segundo caso<sup>220</sup>, se ha demostrado que el tratamiento de ratones con cerulenina tiene un efecto dual en hígado y músculo, con una inhibición de la actividad CPT I en primer lugar seguida por una estimulación, probablemente mediada por una activación del sistema nervioso simpático.

En resumen, el C75 actúa tanto centralmente reduciendo la ingesta de comida y podría estimular periféricamente la actividad CPT I y la oxidación de ácidos grasos,

---

<sup>217</sup> Yang N, Krays JS, Skillman TR, Burris L, Seng TW, Hammond C. C75 activates carnitine palmitoyltransferase I in isolated mitochondria and intact cells without displacement of bound malonyl-CoA. *J Pharmacol Exp Ther* 2005, 312:127-133

<sup>218</sup> Bremen J, Woldergiorgis G, Schalinske K, Shrago E. Carnitine palmitoyltransferase. Activation by palmitoyl-CoA and inactivation by malonyl-CoA. *Biochim Biophys Acta* 1985, 833:9-16

<sup>219</sup> Thupari JN, Pinn ML, Kuhajda FP. Fatty acid synthase inhibition in human breast cancer cells leads to malonyl-CoA-induced inhibition of fatty acid oxidation and cytotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 2001, 285:217-223

<sup>220</sup> Jin YJ, Li SZ, Zhao ZS, An JJ, Kim RY, Baik JH, Lim SK. Carnitine palmitoyltransferase I (CPT I) activity stimulation by cerulenin via sympathetic nervous system overrides cerulenin's peripheral effect. *Endocrinology* 2004, 145: 3197-3204

conduciendo a una drástica pérdida de peso y a una pérdida de masa grasa en tejido adiposo e hígado.

En este estudio se examina con más detalle el efecto del C75 sobre la actividad CPT I *in vitro* e *in vivo* en músculo esquelético.

## **OBJETIVOS**



## OBJETIVOS

El objetivo de esta tesis es evaluar si una oxidación incrementada de ácidos grasos en músculo es capaz de evitar la acumulación de derivados lipídicos y la resistencia a la insulina ocasionada por éstos. Para ello se ha decidido potenciar la oxidación de ácidos grasos siguiendo dos metodologías: sobreexpresar la enzima que regula la oxidación de los ácidos grasos, la carnitina palmitoiltransferasa I (CPT I) y activar farmacológicamente la actividad CPT I.

Para la primera aproximación se ha decidido sobreexpresar la isoforma hepática de CPT I, la L-CPT I, ya que ésta es menos sensible a su inhibidor fisiológico, el malonil-CoA, y también se ha sobreexpresado una forma mutada de la enzima insensible al malonil-CoA, la L-CPT I M593S. Además, para potenciar más la oxidación de ácidos grasos, se ha estudiado el papel de la proteína transportadora de ácidos grasos FAT/CD36 en la  $\beta$ -oxidación mitocondrial, sobreexpresándola mediante adenovirus en células L6E9.

Para la segunda aproximación se ha estudiado el efecto del C75, un activador de la CPT I descrito recientemente, sobre la actividad CPT I y la oxidación de palmitato en músculo esquelético.

En resumen los objetivos de esta tesis son los siguientes:

1. Evaluar la sobreexpresión de la carnitina palmitoiltransferasa I (L-CPT I) wt y un mutante insensible a malonil-CoA (M593S) en células de músculo esquelético de rata y su efecto protector en la resistencia a la insulina inducida por ácidos grasos.
2. Estudiar el papel de la proteína transportadora de ácidos grasos FAT/CD36 en la oxidación de palmitato en células L6E9.
3. Estudiar el efecto del C75 en la actividad de la carnitina palmitoiltransferasa I y en la oxidación de palmitato en células musculares.





## **MATERIALES Y MÉTODOS**



## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1. ANIMALES**

Se han empleado ratones de la cepa C57BL/6J de seis semanas de edad y adquiridos de Harlan Co. Las ratas, de la cepa Wistar, se han obtenido del estabulario de la facultad de Farmacia. Los animales se mantienen a 23°C en un ciclo de 12 h de oscuridad y 12 h de luz y con libre acceso a agua y comida. Los ratones se sacrifican por dislocación cervical y las ratas por dislocación cervical previa anestesia con ketamina/xilacina. Todos los protocolos han sido aprobados por el comité de ética de experimentación animal de la Universidad de Barcelona.

#### **1.1. TRATAMIENTOS**

##### **Tratamiento con C75 y etomoxir**

El C75 o el etomoxir se inyectan intraperitonealmente en ratones a una concentración de 20 mg/kg de peso en medio RPMI 1640 a partir de una solución stock 100 mM en DMSO.

### **2. CULTIVOS CELULARES**

Todas las soluciones usadas para cultivos celulares (PBS 1X, Hepes, agua destilada, etc.) se esterilizan mediante autoclave a 121°C durante 30 minutos o filtrándolas por un filtro de 0,22 µm (Millipore). Los sueros utilizados se inactivan previo uso calentando a 56°C durante 30 min.

## **2.1. SOLUCIONES Y PROCEDIMIENTOS BÁSICOS EN CULTIVOS CELULARES**

### **Inactivación del suero**

El papel principal del suero en los cultivos celulares es abastecer de hormonas y factores de crecimiento a las células para su correcto crecimiento. Además el suero tiene una cascada de proteínas sensible al calor, compuesta en vertebrados como mínimo por 20 glucoproteínas, llamada complemento. El complemento activado tiene una actividad proteolítica muy potente que puede ser dañina para la función de las proteínas de membrana de las células en cultivo y por lo tanto para su viabilidad. Por este motivo, el complemento debe ser inactivado antes de usar el suero.

Las botellas de suero se guardan a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Para inactivar el suero primero se descongelan las botellas en un baño de agua a  $37^{\circ}\text{C}$  y se mezcla bien el suero por inversión de la botella. Después se calienta a  $56^{\circ}\text{C}$  durante 30 min, se hacen alícuotas de 50 ml y se guardan a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **Contaje de células**

Las células se cuentan utilizando una cámara de Neubauer. Se cogen 10  $\mu\text{l}$  de una suspensión de células y se ponen entre la cámara de Neubauer y un cubreobjetos. Bajo el microscopio se cuentan las células que hay en cada uno de los cuatro cuadrantes de 16 cuadraditos cada uno. Del número resultante se hace la media y se multiplica por 10.000. Este valor nos dará el número de células por ml. Multiplicando por los ml totales de células que tenemos sabremos el número total de células.

### **Congelación de células**

El número de células recomendado para congelar es de 10 millones para las células HEK-293 y de 1-2 millones para las L6E9. Las células se desenganchan de la placa usando tripsina (L6E9) o medio (HEK-293) y se resuspenden en 10 ml de medio. Se centrifuga a 1.500 rpm para bajar las células y se resuspenden en 1,5 ml de medio y 150  $\mu\text{l}$  de DMSO por alícuota a congelar. El DMSO es un agente crioprotector que evita la formación de cristales de agua en las células, así como una congelación muy rápida. Pero la concentración de DMSO usada (10%) es tóxica para las células a temperatura ambiente, por esta razón las células se ponen rápidamente en un tubo criogénico y se

guardan a  $-80^{\circ}\text{C}$  en un recipiente con isopropanol que baja la temperatura  $1^{\circ}\text{C}$  por minuto. Al día siguiente las células se guardan en  $\text{N}_2$  líquido.

### **Descongelación de células**

Las células guardadas en el tubo criogénico se descongelan en un baño de agua a  $37^{\circ}\text{C}$  y se diluyen en 10 ml de medio. Se centrifuga a 1.500 rpm y se aspira el medio con el DMSO. Las células se resuspenden en medio nuevo y se siembran en las placas. El medio se cambia al día siguiente.

### **Soluciones**

#### HEPES 1,25 M pH 7,4

Se disuelven 59,5 g de Hepes en 200 ml de agua destilada y se filtra usando un Stericup (Millipore, ref. SCGPU05RE) de  $0,22\ \mu\text{m}$ . El pH se ajusta a 7,4 usando NaOH. Esta solución se guarda a  $4^{\circ}\text{C}$ .

#### PBS 1X

Para obtener 1 l de PBS 1X se disuelven 8 g de NaCl, 1,44 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,2 g de KCl y 0,2 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en 1 l de agua destilada. Se ajusta el pH a 7,4, se autoclava y se guarda a  $4^{\circ}\text{C}$ . El PBS se utiliza para lavar las células eliminando las células no enganchadas o muertas manteniendo el pH y la presión osmótica fisiológicas para las células.

## **2.2. CÉLULAS L6E9**

Se ha utilizado la línea celular L6E9 derivada de músculo esquelético de rata por su fácil manipulación y mantenimiento, así como por sus buenas características para este estudio, puesto que conserva las propiedades metabólicas fundamentales del músculo esquelético. Esta línea celular ha sido cedida por el Dr. Antonio Zorzano, de la Universidad de Barcelona. Las células se crecen en una atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5 % y a  $37^{\circ}\text{C}$  en DMEM (Gibco Invitrogen Corporation, ref. 41966-029), 25 mM glucosa, 1 mM piruvato de sodio, 2 mM glutamina, 25 mM Hepes pH 7,4, 10% FBS (Gibco Invitrogen Corporation, ref. 10270-106), 100 U/ml penicilina y 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  estreptomicina (Medio de Crecimiento). La diferenciación se induce cuando las células (miocitos) están preconfluentes (70-80 %) bajando el porcentaje de FBS al 2% (Medio de Diferenciación). Después de 4 días en este medio se considera que las células están

completamente diferenciadas y se han convertido en miotubos. Las infecciones con los adenovirus y las incubaciones con palmitato se hacen en medio sin suero (medio de infección).

Los distintos medios se preparan según la siguiente tabla:

MEDIO L6E9	CRECIMIENTO	DIFERENCIACIÓN	INFECCIÓN
FBS	57 ml	10,4 ml	-
Hepes 1,25 M pH 7,4	11,4 ml	10,4 ml	10 ml
Penicilina/Estreptomina (10 <sup>4</sup> U/ml-10 <sup>4</sup> mg/ml)	5,7 ml	5,2 ml	5 ml
DMEM 25 mM glucosa	500 ml	500 ml	500 ml

Las células se crecen en placas de 100 mm de diámetro y el medio de cultivo se cambia cada dos días. Primero se lavan las células con PBS 1X estéril y el medio precalentado a 37°C se añade en las siguientes cantidades: 10 ml para las placas de 100 mm de diámetro, 4 ml para las botellas de 25 cm<sup>2</sup>, 15 ml para las placas de 150 mm de diámetro, 2 ml para cada pocillo de una placa de 6 pocillos y 1 ml para las placas de 12 pocillos.

El pase del cultivo se hace cada 2-3 días tripsinizando las células. Para ello primero se lavan las células con PBS 1X para eliminar cualquier residuo de medio de cultivo y después se añade 1 ml de Tripsina-EDTA 1X (Gibco Invitrogen Corporation, ref. 25300-062). Después de 1 min las células ya se han desenganchado, se resuspenden en medio de crecimiento pipeteando suavemente y tras ello se reparten como se desee.

### 2.3. CÉLULAS HEK-293

Las células HEK 293 derivadas de riñón de embrión humano se han obtenido de *European Collection of Cell Cultures* (ECACC). Las células se crecen en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 % y a 37°C en DMEM (Gibco Invitrogen Corporation, ref. 41966-029), 25 mM glucosa, 1 mM piruvato de sodio, 4 mM glutamina, 10 % (v/v) FCS (Biological Industries, ref. 04-001-1A, Lot. 816983), 100 U/ml penicilina y 100

µg/ml estreptomicina (medio de cremiento). La infección con los adenovirus se hace en medio 5% FCS (medio de infección).

La composición de los diferentes medios es:

MEDIO HEK-293	CRECIMIENTO	INFECCIÓN
FCS	50 ml	25 ml
Penicilina/Estreptomicina (10 <sup>4</sup> U/ml-10 <sup>4</sup> mg/ml)	5 ml	5 ml
DMEM 25 mM glucosa	500 ml	500 ml

El pase del cultivo se hace cada 2-3 días. Para ello primero se lavan las células con PBS 1X para eliminar cualquier residuo de medio de cultivo y después se añaden 10 ml de medio de crecimiento y se pipetea suavemente hasta que las células se desenganchen. No es necesario usar tripsina con estas células puesto que su adhesión a la placa no es muy fuerte. Después se reparten como se desee. Para los experimentos las células se crecen hasta confluencia.

## 2.4. TRATAMIENTOS CELULARES

### Tratamiento basal

Este tratamiento basal es necesario para los ensayos de actividad CPT I, de oxidación de palmitato, de viabilidad, cuando se examina el efecto de la presencia de etomoxir o cuando es necesario unir los ácidos grasos libres a BSA.

Las células se lavan con KRBH 0,1% BSA libre de ácidos grasos y se incuban 30 min con KRBH 1% BSA. Después se lavan las células de nuevo con KRBH 0,1 % BSA.

KRBH: NaCl 135 mM, KCl 3,6 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 mM, MgSO<sub>4</sub> 0,5 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,5 mM, NaHCO<sub>3</sub> 2 mM y HEPES 10 mM, pH 7,4. El KRBH se prepara el mismo día del ensayo como se muestra a continuación:

KRBH (para 100 ml)	
KRB 5X	20 ml
NaHCO <sub>3</sub> 100 mM	2 ml
HEPES 1 M pH 7,4	1 ml
H <sub>2</sub> O destilada	77 ml

KRB 5X: contiene CaCl<sub>2</sub> que debe ser disuelto separadamente porque precipita. El KRB 5X se guarda a 4°C y se prepara según la siguiente tabla:

KRB 5X (para 500 ml)	
NaCl	19,72 g
KCl	0,67 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,17 g
MgSO <sub>4</sub>	0,25 g
CaCl <sub>2</sub>	0,55 g
H <sub>2</sub> O destilada hasta	500 ml

BSA 10%: se disuelven 3 g de BSA libre de ácidos grasos (Sigma-Aldrich, ref. A-6003) en 30 ml de KRBH. La solución se guarda a 4°C.

### **Tratamiento con palmitato**

Con este tratamiento se persigue inducir la resistencia a la insulina en las células L6E9. El tratamiento consiste en la incubación durante 16 h de las células con palmitato 0,25 mM en medio de infección (DMEM sin FBS). El palmitato usado está conjugado a BSA a una relación 5:1 (palmitato:BSA). Las células control se incuban con la concentración equivalente de BSA (0,05 mM) pero sin palmitato.

#### Palmitato 2,5 mM unido a BSA (relación molar 5:1)

Se pesan 6,97 mg de palmitato frío y se disuelven en 1 ml de NaOH 0,1 N calentando a 70-80 °C hasta que la solución sea transparente. Por otro lado se disuelve



0,325 g BSA libre de ácidos grasos (Sigma-Aldrich, ref. A-6003) en 8 ml de NaCl 0,9 %. Se mantiene esta solución a 45-50 °C. Una vez la solución de palmitato es transparente, se añade gota a gota sobre la solución de BSA y se va agitando lentamente. De esta forma conseguimos que el palmitato se conjugue con la albúmina. La solución resultante se filtra a través de un filtro de 0,45 µm y se guarda en alícuotas de 1 ml a -20 °C.

### **Tratamiento con C75**

Las células se incuban 2 h a 37°C en medio de diferenciación con 20 ó 40 µg/ml de C75 (Alexis Biochemicals, ref. 270-286-M005, 5 mg) o 40 µg/ml de etomoxir. El C75 y el etomoxir se añaden a partir de una solución stock 100 mM en DMSO guardada a -20°C. Las células control se incuban con la cantidad equivalente de DMSO. Después de la incubación, las células se lavan con PBS 1X y se realiza el experimento.

## **2.5. VIABILIDAD CELULAR**

El efecto citotóxico del C75 sobre las células se ha determinado usando un método basado en la reducción de sales de tetrazolio a formazán mediante las deshidrogenasas mitocondriales<sup>1</sup>. El aumento del número de células viables provoca un aumento de la actividad total de las deshidrogenasas mitocondriales y con ello un aumento de los cristales de formazán formados, aumentando la intensidad del color de éstos. Esta coloración de los cristales de formazán se cuantifica usando un espectrofotómetro midiendo la absorbancia a 570 nm.

El proceso completo es el siguiente: las células se siembran en placas de 12 pocillos y se diferencian como se ha descrito anteriormente. Las células se incuban con C75 durante 2 h en medio de diferenciación. Después se incuban 2 h con 1 ml de medio con 200 µl de solución MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). El MTT es reducido por las deshidrogenasas mitocondriales dando lugar a cristales azules de formazán. Las células se recogen en tubos de 1,5 ml y se lavan con PBS 1X. El *pellet* de células se lisa añadiendo 1 ml de solución de lisis provocando la liberación y disolución de los cristales de formazán. La intensidad de

---

<sup>1</sup> Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 1983, 65:55-63

coloración de estos cristales se cuantifica midiendo la absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro usando la solución de lisis como blanco. Los resultados se expresan como porcentaje de absorbancia respecto a las células control.

#### Solución MTT (0,25 %)

Se pesan 25 mg de MTT (Sigma-Aldrich, ref. M-2128) y se disuelven en 10 ml de PBS 1X. Se filtra con un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  y se guarda a 4°C.

#### Solución de lisis MTT : SDS 10 % y 1 mM ácido acético en DMSO

Para 30 ml se disuelven 3 g de SDS y 171,6  $\mu\text{l}$  de ácido acético glacial en 30 ml de DMSO. Esta solución se prepara el mismo día del experimento.

### **3. ADENOVIRUS**

Se han utilizado los adenovirus como herramienta de transferencia genética debido a sus características de crecimiento e infectividad. Los adenovirus pueden ser producidos en grandes cantidades y son capaces de introducir ADN en una gran variedad de tipos celulares de mamífero, incluyendo células con baja tasa de crecimiento. Además, pueden albergar trozos de ADN relativamente grandes (hasta 5-7 kb). Los adenovirus se integran en el genoma de la célula huésped con muy baja eficiencia (evitando así los problemas de mutagénesis insercional) y existen predominantemente en forma de episomas, haciendo que la expresión del transgen sea transitoria<sup>2</sup>.

#### **3.1. BIOLOGÍA DEL ADENOVIRUS**

Los adenovirus son una gran familia de virus sin envuelta celular y con un ADN de doble hebra. Estos virus fueron aislados por primera vez de tejido adenoidal humano

---

<sup>2</sup> Becker TC, Noel RJ, Coats WS, Gómez-Foix AM, Alam T, Gerard RD, Newgard CB. Use of Recombinant adenovirus for metabolic engineering of mammalian cells. *Methods in cell biology*. 1994, 43:161-189

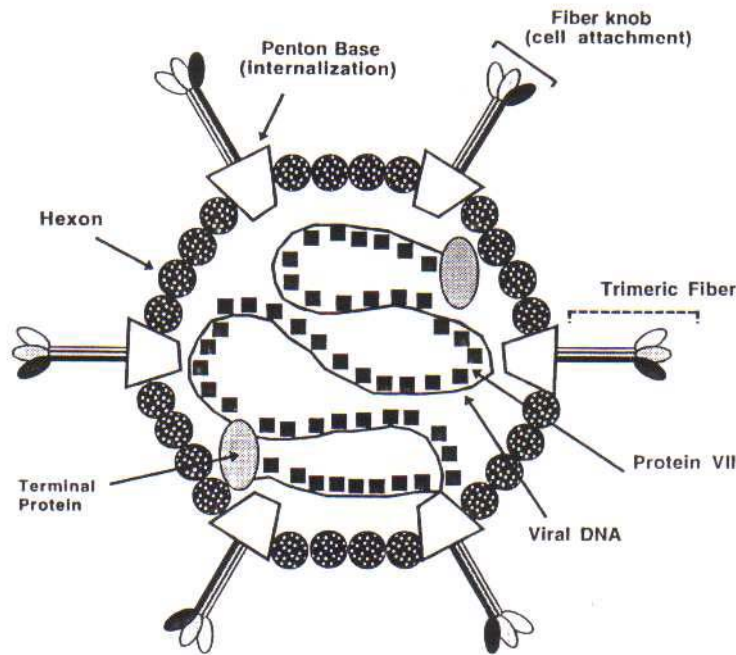
en 1953<sup>3</sup>. Los serotipos 2 (Ad2) y 5 (Ad5) de adenovirus humanos han sido los más estudiados. Para nuestro estudio se ha utilizado el serotipo 5.

La partícula del adenovirus consiste en una cápside proteica icosaédrica de 75 nm de diámetro que encapsula una molécula de ADN de doble hebra de aproximadamente 36 kb (ver figura 1). La proteína viral más abundante es el hexon, que constituye la mayor parte de la cápside del virus. En cada vértice hay un complejo formado por las proteínas pentona base y fibra. Ambas proteínas juegan un papel importante en la interacción del adenovirus con los receptores de la célula huésped durante la infección. El ADN adenovírico está empaquetado en un complejo con varias proteínas víricas y cada extremo del cromosoma está unido covalentemente a una molécula de proteína terminal (TP). Esta proteína actúa como cebador para la síntesis de ADN y sirve también como punto de anclaje del cromosoma viral a la matriz nuclear.

El ciclo lítico de los adenovirus se divide en dos fases: la fase temprana y la fase tardía. La fase temprana ocurre antes de la replicación del ADN vírico y la fase tardía ocurre después. En base a esta distinción, los genes del genoma vírico, se dividen en genes tempranos (E1, E2, E3 y E4) y en genes tardíos. Las estrategias para el uso de los adenovirus como herramientas de transferencia genética se centran en la eliminación de determinadas partes del genoma del virus para la introducción del inserto de ADN. Los adenovirus salvajes pueden albergar hasta 2 kb de ADN exógeno, pero la delección de los genes E1 y E3 permite el alojamiento de insertos de hasta 7 kb. La delección del gen E1 bloquea la expresión de la mayor parte de los genes del virus así como la síntesis de ADN, provocando que el adenovirus sea deficiente en su replicación. Las proteínas codificadas por el gen E3 están involucradas en el escape del virus de la respuesta inmune del organismo huésped. Por lo tanto, usando un adenovirus deficiente en su replicación, las células pueden ser infectadas sin que se perturbe su crecimiento ni sus funciones normales, permitiendo el análisis de las propiedades funcionales de la proteína recombinante.

---

<sup>3</sup> Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, Parrott RH, Ward TG. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1953, 84:570-573



**Fig. 1. Esquema de una partícula de adenovirus.** El hexón constituye la mayor parte de la estructura de la cápside, junto con el complejo proteico pentona base-fibra, que se localiza en los vértices. El ADN de doble cadena está empaquetado en un complejo con la proteína VII, y una molécula de proteína terminal está unida covalentemente a cada extremo del cromosoma.

En el caso de la delección del gen E1, la propagación del adenovirus viene condicionada por la presencia de este gen que debe ser proporcionado en *trans*. Esto se consigue creciendo los adenovirus en la línea celular HEK-293, que fue originariamente transformada con Ad5 y contiene un 14% del genoma del adenovirus integrado en su ADN celular, incluyendo la región E1<sup>4</sup>.

Aunque los adenovirus recombinantes no pueden propagarse en otras células que no sean las células HEK-293, si se adhieren sobre la piel, o en las vías respiratorias, pueden entrar en las células y expresar la proteína recombinante. Por esta razón se han de utilizar medidas de seguridad como el uso de guantes y trabajar bajo una campana de seguridad.

<sup>4</sup> Graham FL, Smiley J, Russeell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 1977, 36:59-72

### 3.2. MANIPULACIÓN DE ADENOVIRUS COMO HERRAMIENTA DE TRANSFERENCIA GÉNICA

En este estudio se ha utilizado el virus Ad-LacZ (expresa el gen de la  $\beta$ -galactosidasa de bacterias) como control, Ad-LCPT I wt (expresa la forma salvaje de la L-CPT I de rata), Ad-LCPT I M593S (expresa una forma mutada insensible a malonil-CoA de la L-CPT I de rata) y Ad-FAT/CD36 (expresa la FAT/CD36 de rata). Los tres primeros virus han sido previamente obtenidos en nuestro grupo<sup>5,6</sup> y el virus Ad-FAT/CD36 ha sido generosamente cedido por la Dra. Anna María Gómez-Foix (Universidad de Barcelona).

#### 3.2.1. Amplificación de adenovirus

Una vez obtenidos los clones virales, el siguiente paso es su amplificación en células HEK 293 para su posterior uso. La amplificación del stock viral se compone de dos pasos:

1. Primera amplificación: se crece una placa de 100 mm de diámetro de células HEK 293 hasta 70% de confluencia y se infecta con 50  $\mu$ l del stock viral en 5 ml de medio 5% FCS. Pasadas 1,5 horas, se añaden 5 ml más de medio y se incuban las células durante 2-3 días más. Después de este tiempo, cuando las células estén muertas, se recogen y se hacen tres ciclos de congelación/descongelación con N<sub>2</sub> líquido para romper las células y que todos los virus que hayan podido quedar dentro de ellas salgan. Se centrifuga a 2.500 rpm 5 min para bajar los restos celulares y se guarda el sobrenadante con los virus a  $-80^{\circ}\text{C}$ .
2. Segunda amplificación: esta será la amplificación final, y los virus obtenidos tras ella podrán ser usados directamente para transducir las células. Para ello se infectan 10-20 placas de 150 mm de diámetro de células HEK 293 a 70% de confluencia con 400  $\mu$ l de la amplificación anterior por cada placa. La infección se hace en 5 ml de medio 5% FCS. Después de 1,5 h se añaden 10 ml más de medio y se incuban las células durante 2-3 días. En este paso debemos ir

---

<sup>5</sup> Rubi B, Antinozzi PA, Herrero L, Ishihara H, Asins G, Serra D, Wollheim CB, Maechler P, Hegardt FG. Adenovirus-mediated overexpression of liver carnitine palmyltransferase I in INS-1E cells: effects on cell metabolism and insulin secretion. *Biochem. J.* 2002, 219-226

<sup>6</sup> Herrero L, Rubi B, Sebastián D, Serra D, Asins G, Maechler P, Prentki M, Hegardt FG. Alteration of the malonyl-CoA/carnitine palmitoyltransferase I interaction in the  $\beta$ -cell impairs glucose-induced insulin secretion. *Diabetes* 2005, 54:462-471

observando las células cada día para recogerlas cuando se empiecen a desenganchar de la placa (estarán redondas y brillantes) pero sin que aún estén muertas. De esta forma recogeremos las células estando la mayoría de los virus dentro de ellas. Después de recoger las células y centrifugarlas a 2.500 rpm, se concentran en 10-15 ml de medio 5% FCS y se hacen tres ciclos de congelación/descongelación. De esta forma, obtendremos todos los virus concentrados en 10-15 ml de medio, siendo posible obtener una amplificación con un título elevado (del orden de  $10^9$ - $10^{10}$  pfu/ml). La amplificación se guarda en alícuotas de 100  $\mu$ l a  $-80^\circ\text{C}$ .

### 3.2.1. Titulación de adenovirus

La cuantificación o titulación de los stocks de adenovirus es importante para asegurar la reproducibilidad entre las muestras así como para conseguir el nivel correcto de expresión del gen a sobreexpresar. La titulación se ha llevado a cabo utilizando el kit *Adeno-X<sup>TM</sup> Rapid Titer Kit* (Clontech, ref. K1653-1). El método se basa en la detección de la proteína viral hexon para la cuantificación del número de partículas virales presentes en la célula, ya que todas aquellas células infectadas presentarán esta proteína en la membrana. Las células se infectan con diferentes diluciones del virus y después de 48 h las células se fijan y se incuban con el anticuerpo primario anti-hexon. La señal se detecta después de una incubación con un anticuerpo secundario conjugado a la peroxidasa de rábano y la exposición posterior al sustrato DAB (3,3'-diaminobenzidina) que teñirá de un color marrón sólo aquellas células que hayan sido infectadas. El título del stock se determina contando el número de células infectadas en una determinada área, considerando que cada célula teñida de marrón corresponde con una unidad de infección.

El protocolo de titulación es el siguiente: se siembra 1 ml de células HEK 293 ( $5 \times 10^5$  células/ml) en cada pocillo de una placa de 12 pocillos. Se preparan 10 diluciones del virus desde  $10^{-2}$  hasta  $10^{-7}$  en medio 10% FCS. Se añaden 100  $\mu$ l de cada dilución en cada pocillo y se incuban las células durante 48 h. Pasado este tiempo, se aspira el medio y las células se dejan secar al aire en la campana de flujo laminar durante 5 min. Entonces las células se fijan añadiendo muy suavemente para no separar la monocapa de células de la placa 1 ml de metanol frío ( $-20^\circ\text{C}$ ) en cada pocillo. Las células se mantienen 10 min a  $-20^\circ\text{C}$  en el congelador y se lavan muy suavemente tres veces con PBS 1X BSA 1% (Sigma, Fracción V, ref. A-3803). Las células se incuban entonces

durante 1 h con 500 µl/pocillo de una dilución 1/3.000 en PBS 1X BSA 1% del anticuerpo anti-hexon. Pasada este tiempo, las células se lavan tres veces muy suavemente con PBS 1X BSA 1% y se incuban 1 h con 500 µl/pocillo de una dilución 1/500 del anticuerpo de rata anti-ratón conjugado con HRP. Después de esta incubación se lava de nuevo como antes y se incuban las células con 500 µl/pocillo del sustrato DAB durante 10 min a temperatura ambiente.

Para calcular el título del stock vírico, se aspira el sustrato DAB y se añade 1 ml de PBS 1X por pocillo y se cuentan las células teñidas de marrón de como mínimo tres campos visuales con el microscopio con el objetivo de 20X. Aplicando la siguiente fórmula se calcula el título del virus en pfu/ml:

$$\text{Título (pfu/ml)} = [(\text{células infectadas/campo}) \times 573] / [0,1 \times \text{factor de dilución}]$$

donde 573 es el número de campos por pocillo bajo el aumento 20X del microscopio y 0,1 es el volumen en ml de la dilución viral utilizada.

### 3.2.2. Infección con adenovirus

La infección con los adenovirus o transducción depende del tipo celular utilizado. Dependiendo del tipo de crecimiento celular o de la expresión de los receptores que usan los adenovirus para internalizarse la infección puede ser más o menos rápida. Para las células usadas en este estudio, debido a su dificultad de infección, se ha escogido el tiempo de 30 h para permitir una buena expresión de la proteína de interés. Con este tiempo no se han visto efectos citotóxicos con las cantidades de virus utilizadas. El proceso general de infección para las células L6E9 se detalla a continuación.

Las células se crecen hasta 80-90 % de confluencia y se diferencian como se ha descrito anteriormente. A día 4 de diferenciación (las células ya se han diferenciado completamente) se infectan las células con la cantidad de virus correspondiente en medio de infección y se dejan en este medio durante 30 h. Pasado este tiempo, se cambia el medio de infección por medio de infección nuevo y se incuban durante 16 h más antes de realizar el experimento. Las infecciones se hacen en 1 ml para las placas de 12 pocillos, 2 ml para las placas de 6 pocillos, 4 ml para las botellas de 25 cm<sup>2</sup>, 10 ml para las placas de 100 mm de diámetro y 15 ml para las placas de 150 mm de diámetro.

## 4. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

### 4.1. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA POR EL MÉTODO DE BRADFORD

El método de determinación de la concentración proteica descrito por Bradford<sup>7</sup> se basa en que algunos colorantes, cuando interaccionan con las proteínas cambian su espectro de absorción. El reactivo de Bradford contiene cobre en un medio de ácido ortofosfórico y metanol. Cuando la proteína une el cobre, su máximo de absorción cambia de 465 nm a 595 nm. Este método es altamente sensible y lineal.

La cuantificación proteica se realiza siguiendo las instrucciones del fabricante (Bio-Rad *protein assay*, ref. 500-0006) usando BSA como estándar en el rango de 1-50 µg/µl. El reactivo de Bradford se diluye 1/5 en el momento de usar y se prepara la cantidad necesaria para cada determinación. La solución *stock* del estándar de BSA se prepara a 1 µg/µl y las absorbancias del blanco, los patrones y las muestras se miden a 595 nm en un volumen final de 1 ml en cubetas de plástico de 1 cm de paso de luz.

Muestra	Volumen	Tampón	Bradford 1/5
Blanco	-	50 µl	1 ml
2 µg BSA	2 µl	48 µl	1 ml
5 µg BSA	5 µl	45 µl	1 ml
10 µg BSA	10 µl	40 µl	1 ml
20 µg BSA	20 µl	30 µl	1 ml
50 µg BSA	50 µl	-	1 ml
Problema	5-40 µl	45-10 µl	1 ml

### 4.2. WESTERN BLOT

Mediante la técnica del western blot podemos detectar una proteína específica entre una muestra de proteínas que han sido separadas mediante electroforesis y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. La técnica se ha aplicado para la

<sup>7</sup> Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976, 72:248-254



detección de las proteínas LCPT I, MCPT I, Akt/PKB, p-Akt/PKB (Ser 473) y FAT/CD36. El proceso consta de los siguientes pasos:

#### a) Electroforesis

La electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) es una técnica comúnmente utilizada para la separación de proteínas según su tamaño. En este tipo de geles las proteínas o sus subunidades migran hacia el ánodo según su tamaño molecular de forma desnaturalizada.

*Preparación de la muestra:* las células se recogen directamente de un pocillo de una placa de 6 pocillos con 40  $\mu$ l de tampón de carga 1X. Este tampón contiene el agente desnaturalizante SDS y  $\beta$ -mercaptoetanol que reduce los puentes disulfuro. Las muestras se sonicen durante 5 segundos y se hierven otros 5 minutos a 95°C. Después se centrifugan brevemente y se ponen en hielo hasta ser cargadas en el gel. Las muestras pueden guardarse en tampón de carga a -20°C durante 4-6 meses. Sin embargo después de 10 o más ciclos de congelación-descongelación las proteínas pueden empezar a degradarse provocando una pérdida de intensidad en las bandas obtenidas después en la inmunodetección.

*Preparación del gel:* se han utilizado geles al 8% y al 12 % de poliacrilamida y de 1,5 mm de grosor. Para la preparación de los geles se ha utilizado el kit Mini-Protean III de Bio-Rad. Se prepara el gel separador y se añade la mezcla entre dos cristales del aparato de electroforesis previamente lavados con etanol. Para ayudar a la formación de un frente homogéneo puede añadirse una pequeña cantidad de isopropanol. La polimerización se induce añadiendo al final el TEMED y el persulfato de amonio. Cuando el gel separador se ha polimerizado, se quita el isopropanol y se añade el gel apilador y el peine de 1,5 mm de grosor entre los dos cristales. La polimerización de ambos geles tarda aproximadamente unos 30 minutos.

*Electroforesis:* Antes de llevar a cabo la electroforesis se quita el peine, se prepara el tampón de electroforesis y se llena la cubeta. Las muestras y el marcador de pesos moleculares (Invitrogen, ref. LC5925) se cargan en el gel y la electroforesis se realiza a una corriente constante de 30 mA durante aproximadamente 1 hora. La electroforesis se para cuando el azul de bromofenol del tampón de carga está a punto de salirse del gel.

Tampón de carga 1X: Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS 4%, β-mercaptoetanol 5%, glicerol 10% y azul de bromofenol 10%. Se guarda a -20°C en alícuotas de 1 ml. La composición para 25 ml es:

<b>Tampón de carga 1X</b>	
Tris-HCl 1,25 M pH 6,8	1,25 ml
SDS	0,5 g
β-mercaptoetanol	1,25 ml
Glicerol 87%	2,9 ml
Azul de bromofenol	2,5 mg
H <sub>2</sub> O hasta	25 ml

Preparación de geles SDS-PAGE: para un gel de 1,5 mm de grosor

<b>Gel separador (7,5 ml)</b>	<b>8%</b>	<b>12%</b>
H <sub>2</sub> O destilada	4,4 ml	3,65 ml
Acrilamida 40%	1,5 ml	2,25 ml
Tris-HCl 1,875 M pH 8,8	1,5 ml	1,5 ml
SDS 10%	75 µl	75 µl
Persulfato de amonio 10%	25 µl	25 µl
TEMED	3,75 µl	3,75 µl

Gel apilador (2,5 ml)	6%
H <sub>2</sub> O destilada	1,8 ml
Acrilamida 40%	0,4 ml
Tris-HCl 1,875 M pH 8,8	0,25 ml
SDS 10%	25 µl
Persulfato de amonio 10%	8,5 µl
TEMED	2,5 µl

La acrilamida es un potente agente neurotóxico. El contacto con la piel así como su inhalación deben ser evitados. El persulfato de amonio 10% se prepara disolviendo 0,5 g de persulfato de amonio en 5 ml de H<sub>2</sub>O destilada y se guarda a 4°C.

Tampón de electroforesis: Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0,1%. Se prepara diez veces concentrado y se guarda a temperatura ambiente. Para 1 l:

Tampón de electroforesis 10X	
Tris	30,3 g
SDS	10 g
Glicina	144,2 g
H <sub>2</sub> O hasta	1 l

## b) Transferencia

Una vez acabada la electroforesis se procede a la transferencia de las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa para la posterior inmunodetección. Primero se separa el gel apilador del gel separador y éste último se utiliza para la transferencia. Se sitúan, en este orden, de abajo a arriba y previamente mojados en tampón de transferencia: una esponja, 2 papeles Whatman, el gel, la membrana de nitrocelulosa, 2 papeles Whatman y otra esponja. Todo el montaje se sumerge en un tampón de transferencia y evitando la formación de burbujas. En cada paso se controla la ausencia de burbujas de aire, y si es necesario, se eliminan ayudándose con un tubo de vidrio. La

transferencia se lleva a cabo a 4°C y a 250 mA 1 h o 125 mA 2 h. Una vez acabada la transferencia, la membrana se lava con PBS 1X y la eficiencia de la transferencia se comprueba sumergiendo la membrana en solución Ponceau (Sigma-Aldrich, ref. P-7170). Esta solución tiñe las bandas de proteína de un color rojo, permitiendo comprobar si las proteínas se han transferido correctamente. Para eliminar esta tinción se lava la membrana con PBS-Tween durante unos minutos.

Tampón de transferencia: Tris 20 mM, metanol 20% y glicina 150 mM. Se prepara diez veces concentrado y sin metanol. En el momento de usar se diluye diez veces y se añade el metanol. Se guarda a 4°C.

Tampón de transferencia 10X	
Tris	24,2 g
Glicina	120 g
H <sub>2</sub> O c.s.p.	1 l

Tampón de transferencia 1X	Para 800 ml
Tampón transferencia 10 X	80 ml
Metanol	160 ml
H <sub>2</sub> O	560 ml

PBS-Tween: Tween 0,1% en PBS 1X. Diluimos 1 ml de Tween 20 en 1.000 ml de PBS 1X. Se guarda a temperatura ambiente.

### c) Incubación con el anticuerpo

Para la inmunodetección se ha utilizado el *Enhanced ChemiFluorescence (ECF) Western Blotting kit* (Amersham Biosciences, ref. RPN 5781-anti rabbit), que permite el uso de un sistema de escaneo (Storm 840, Molecular Dynamics, Amersham Pharmacia Biotech) para cuantificar por fluorescencia la intensidad de las bandas. La inmunodetección se ha realizado usando un anticuerpo secundario anti-conejo que tiene ligado el enzima de la fosfatasa alcalina seguido de la incubación con el sustrato ECF. La fosfatasa alcalina cataliza la conversión del sustrato ECF en un producto altamente fluorescente a 540-560 nm.

Bloqueo de la membrana: Los lugares de unión inespecíficos se bloquean sumergiendo la membrana en PBS-Tween y 5% leche desnatada (solución de bloqueo) y incubando 1 h a temperatura ambiente en un agitador orbital. Pasado este tiempo, la membrana se lava una vez durante 15 minutos y dos veces durante 5 minutos con PBS-Tween en el agitador orbital.

Incubación con el anticuerpo primario: Los anticuerpos primarios utilizados han sido: anticuerpo policlonal anti-LCPT I contra los aminoácidos 317-430 de la CPT I de hígado de rata producido en conejo<sup>8</sup>, anticuerpo anti-MCPT I contra los aminoácidos 259-760 de la M-CPT I de rata producido en oveja<sup>9</sup>, anticuerpo anti-p-PKB (Ser 473) (Cell Signalling, ref. 9271), anticuerpo anti-PKB/Akt (Santacruz Biotechnologies ref. sc-8312) y anticuerpo anti-FAT/CD36 (Santacruz Biotechnologies ref. sc-9154). Los anticuerpos se diluyen en solución de bloqueo (1/6.000 para el anticuerpo anti-LCPT I, 1/1.000 para los anticuerpos anti M-CPT I, anti-PKB/Akt y anti-FAT/CD36) o en PBS-Tween 5% BSA y 0,02% azida sódica (1/2.500 para el anticuerpo anti-p-PKB Ser 473). La incubación se realiza durante toda la noche a 4°C en un agitador orbital. Después de este tiempo, la membrana se lava con PBS-Tween (un lavado de 15 minutos y dos lavados de 5 minutos). El anticuerpo puede ser reutilizado guardándolo a -20°C o a 4°C (para el anticuerpo anti-p-PKB).

Incubación con el anticuerpo secundario: los anticuerpos secundarios utilizados han sido anti-conejo diluido 1/10.000 en PBS-Tween y anti-oveja diluido 1/5.000. Se incuba durante 1 h a temperatura ambiente en el agitador orbital. Pasado este tiempo se lava la membrana como se ha descrito arriba.

#### **d) Detección**

La membrana se incuba durante 20 min con 1,3 ml de sustrato ECF. Pasado este tiempo se deja secar la membrana y se pone en el escáner de fluorescencia (Storm 840). Para la detección de M-CPT I la detección se hace utilizando el sustrato ECL siguiendo las instrucciones del kit.

---

<sup>8</sup> Prip-Buus C, Cohen I, Kohl C, Esser V, McGarry JD, Girard J. Topological and functional analysis of the rat liver carnitine palmitoyltransferase 1 expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 1998, 429(2):173-178

<sup>9</sup> van der Leij FR, Cox KB, Jackson VN, Huijckman NC, Bartelds B, Kuipers JR, Dijkhuizen T, Terpstra P, Wood PA, Zammit VA, Price NT. Structural and functional genomics of the CPT1B gene for muscle-type carnitine palmitoyltransferase I in mammals. *J Biol Chem* 2002, 277:26994-27005

### e) *Stripping*

En ocasiones es necesario reutilizar la membrana para hacer otra inmunodetección. En estos casos se realiza un *stripping* que consiste en la desunión de los anticuerpos para poder proceder a otra incubación con otros anticuerpos sin que haya una interferencia entre ellos. Para ello primero se incuba la membrana a 50°C durante 30 min en agitación con solución de *stripping* y después se lava con PBS 1X. La membrana está lista para volver a ser utilizada en otro *western blot*. En el caso que la membrana haya sido revelada utilizando el método de ECF, antes de la incubación con la solución de *stripping* se hace una incubación con metanol al 40% (v/v) durante 30 min a temperatura ambiente.

Solución de *stripping*:  $\beta$ -mercaptoetanol 100 mM, SDS 2%, Tris-HCl 62,5 mM pH 6,7

## 5. ENSAYO DE ACTIVIDAD CPT I

Para la determinación de la actividad CPT I se han utilizado fracciones enriquecidas en mitocondrias obtenidas a partir de células en cultivo o de tejido de ratón. El ensayo de actividad se realiza con estas fracciones frescas sin congelar, para evitar la pérdida de actividad debida al proceso de congelación y la aparición de la actividad CPT II (localizada dentro de la mitocondria) debido a la rotura de la mitocondria, que podría conducir a datos erróneos de la actividad CPT I.

### 5.1 OBTENCIÓN DE FRACCIONES ENRIQUECIDAS EN MITOCONDRIAS

#### 5.1.1. Obtención de mitocondrias a partir de células en cultivo

Las células se lavan con PBS y se recogen con ayuda de un *scraper* en 5 ml de PBS 1X. Todo el proceso se hace a 4°C. Se centrifuga a 2.500 rpm para bajar las células y se resuspenden en 2 ml de tampón de homogenización. La obtención de mitocondrias se hace sometiendo las células a un proceso de rotura mediante un homogenizador de vidrio (Wheaton) haciendo 20 homogenizaciones con cada émbolo. Tras este proceso, las células se centrifugan a 2.000 x g 3 min para eliminar los restos celulares, y el sobrenadante se somete a una centrifugación a 16.000 x g durante 30 min. Tras esta

centrifugación se obtiene un *pellet* rico en mitocondrias que se resuspende en 50  $\mu$ l de tampón de homogenización. La concentración de las mitocondrias obtenidas se determina mediante el método de Bradford y el ensayo de actividad se hace con 5-10  $\mu$ g de esta fracción rica en mitocondrias.

Tamón de homogenización: se guarda a temperatura ambiente

KCl 150 mM

Tris-HCl pH 7,2 5 mM

### 5.1.2. Obtención de mitocondrias a partir de músculo de ratón

Para la obtención de mitocondrias de músculo de ratón<sup>10</sup> se extrae el *soleus* o el *gastrocnemius* del ratón y se homogeniza en 9 volúmenes de sacarosa 0,25 M utilizando un homogenizador mecánico (Politron). El homogenizado se centrifuga a 1.000 x g 15 min a 4°C. Se descarta el sobrenadante y se vuelve a homogenizar el *pellet* de forma análoga al paso anterior. Se centrifuga a 600 x g 10 min y el sobrenadante obtenido se centrifuga a 15.000 x g 15 min a 4°C. De esta forma, y tras dos lavados con tampón sacarosa 0,25 M, KCl 0,15 M, obtenemos un *pellet* rico en mitocondrias. La concentración de esta suspensión se determina mediante el método de Bradford y el ensayo de actividad se realiza con 20  $\mu$ g de proteína.

## 5.2 ENSAYO DE ACTIVIDAD CPT I

La actividad CPT I se determina usando un método radiométrico previamente descrito en nuestro grupo<sup>11</sup>. La actividad CPT I se ensaya en fracciones enriquecidas en mitocondrias obtenidas como se ha descrito anteriormente, donde las mitocondrias permanecen intactas. El ensayo se realiza siempre con estas fracciones sin congelar, para evitar la rotura de la mitocondrias y la aparición de la actividad CPT II.

Los sustratos para el ensayo de actividad son L-[metil-<sup>3</sup>H]carnitina hidrocloreuro (Amersham Biosciences, ref. TRK762) y palmitoil-CoA. La reacción se da en la siguiente dirección:

---

<sup>10</sup> Saggerson ED, Carpenten CA. Carnitine palmitoyltransferase in liver and five extrahepatic tissues in the rat. Inhibition by DL-2-bromopalmitoyl-CoA and effect of hypothyroidism. *Biochem. J.* 1986, 236: 137-141

<sup>11</sup> Morillas M, Clotet J, Rubí B, Serra D, Asins G, Ariño J, Hegardt FG. Identification of the two histidine residues responsible for the inhibition by malonyl-CoA in peroxisomal carnitine octanoyltransferase from rat liver. *FEBS Lett.* 2000, 466(1): 183-186



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

La concentración final de cada componente en la reacción es:

Componentes reacción CPT I	
Tris-HCl pH 7,2	105 mM
KCN	2 mM
KCl	15 mM
MgCl <sub>2</sub>	4 mM
ATP	4 mM
GSH	250 μM
Palmitoil-CoA	50 μM
L-[metil- <sup>3</sup> H]carnitina (0,3 μCi)	400 μM
BSA (libre de ácidos grasos)	0,1 %

Las desacilasas convierten el sustrato acil-CoA en el ácido graso y CoA-SH generando ATP. Este proceso puede reducir la disponibilidad del sustrato palmitoil-CoA en la reacción. Es por este motivo que es necesaria la presencia de ATP, ya que de este modo invertimos el equilibrio de la reacción de las desacilasas y estimulamos la reacción de las acil-CoA sintetasas que regenerarán el sustrato palmitoil-CoA. El KCN se añade para evitar la oxidación mitocondrial ya que inhibe la cadena de transporte electrónico. El GSH (glutación reducido) se añade como agente reductor en lugar del DTT (ditiotretol) o DTE (ditioeritrol) porque éstos últimos reducen la sensibilidad a malonil-CoA<sup>12</sup>. El BSA sin ácidos grasos se añade para proteger a las mitocondrias del

<sup>12</sup> Saggerson ED, Carpenter CA. Malonyl-CoA inhibito of carnitine acyltransferase activities: effects of thiol-group reagents. *FEBS Lett.* 1982, 137:124-128



efecto detergente de los ácidos grasos. Sin embargo, la concentración de BSA no puede superar el 0,1% porque sino puede dar un efecto sigmoidal en la cinética del enzima respecto al acil-CoA<sup>12</sup>. Por último, el KCl se añade porque incrementa la actividad del enzima<sup>13</sup>.

El procedimiento para el ensayo de actividad CPT I se detalla a continuación. Primero se prepara la mezcla de reacción que se mantiene en hielo. El GSH se disuelve en agua justo antes de usarlo. Cada muestra se ensaya por duplicado. La mezcla de reacción lleva las siguientes cantidades por punto:

Mezcla de reacción CPT I/punto	
Agua destilada	92,33 µl
Tampón CPT I 4X	40 µl
Palmitoil-CoA 1 mM	10 µl
ATP 80 mM	10 µl
BSA 30%	0,67 µl
GSH 25 mM	2 µl
<sup>3</sup> H-carnitina 16 mM	5 µl
Volumen total	160 µl

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

Mezcla de proteína	
Proteína (suspensión de mitocondrias)	5-20 µg
Tampón CPT I 4X	10 µl
Agua destilada c.s.p.	40 µl

<sup>13</sup> Saggerson ED. Carnitine acyltransferase activities in rat liver and heart measured with palmitoyl-CoA and octanoyl-CoA. Latency, effects of K<sup>+</sup>, bivalent metal ions and malonyl-CoA. *Biochem. J.* 1982, 202:397-405

Una vez preparadas la mezcla de reacción y la mezcla de proteína el ensayo se inicia añadiendo 160  $\mu\text{l}$  de la mezcla de reacción en cada tubo de muestra de proteína. Las muestras se vortean y se ponen en un baño a 30°C durante exactamente 5 min. La reacción se para añadiendo 200  $\mu\text{l}$  de HCl 1,2 M. Las muestras se vortean de nuevo y se ponen en hielo. En este punto podemos dejar el ensayo o continuar procediendo con las extracciones con butanol. Para ello se añaden 600  $\mu\text{l}$  de butanol saturado de agua, se vortea (4 pulsos) y se centrifuga a 13.000 rpm 2 min para separar la fase acuosa de la fase orgánica. Se cogen 400  $\mu\text{l}$  de la fase orgánica superior y se añaden a otra serie de tubos que contienen 200  $\mu\text{l}$  de agua destilada. Las muestras se vortean y centrifugan de nuevo, y se cogen 250  $\mu\text{l}$  de la fase superior y se ponen en un vial con 5 ml de líquido de centelleo (Ecolite, ICN). La radiactividad se cuenta en un contador de centelleo RackBeta.

La actividad específica del enzima se calcula de la siguiente forma:

$$\text{A.E. (nmol x mg prot}^{-1} \text{ x min}^{-1}) = (\text{cpm x 600 } \mu\text{l}) / \text{R.E. x mg prot. x min x 250 } \mu\text{l}$$

donde cpm son las cuentas por minuto y R.E. es la radiactividad específica de la  $^3\text{H}$ -carnitina (aproximadamente 3.000 cpm/nmol).

Tampón CPT I 4X: se guarda a 4°C

Tris-HCl pH 7,2	420 mM
KCN	8 mM
KCl	60 mM
MgCl <sub>2</sub>	16 mM

$^3\text{H}$ -carnitina 16 mM: 6,6 mg de carnitina se disuelven en 982,3  $\mu\text{l}$  de etanol 95% y 982,3  $\mu\text{l}$  de agua destilada. Se añaden 125  $\mu\text{l}$  de L-[metil- $^3\text{H}$ ]carnitina hidrocloreuro (80 Ci/mmol). Se hacen alícuotas de diferentes volúmenes y se guardan a -80°C.

### 5.3 ENSAYO DE INHIBICIÓN POR MALONIL-CoA

Para el ensayo de inhibición por malonil-CoA se procede de la misma manera que la descrita anteriormente pero poniendo las diferentes cantidades de malonil-CoA en la mezcla de proteína ajustando el volumen final a 40  $\mu\text{l}$ . El stock de malonil-CoA a 2 mM se prepara en una solución de acetato de sodio 1 M pH 5,9 y se guarda a -20°C.

Las muestras se vortexean y se preincuban 1 min antes de la adición de la mezcla de reacción. Ha sido descrito que esta preincubación incrementa el nivel de inhibición<sup>14</sup>.

#### 5.4 ENSAYO DE INHIBICIÓN POR ETOMOXIRIL-CoA

El etomoxir (R-(+)-2-[6-(4-clorofenoxi)hexil]oxirano-2-carboxilato de sodio) es un inhibidor irreversible de la CPT I y sólo es activo cuando ha sido transformado a etomoxiril-CoA. El etomoxir ha sido obtenido del Dr. H.P.O. Wolf (Allensbach, Alemania). El efecto del etomoxir se ha estudiado tanto en células en cultivo como en fracciones enriquecidas en mitocondrias de células y de músculo de ratón. Para las células en cultivo, el etomoxir se añade directamente en el medio el tiempo correspondiente, y éste se convierte dentro de la célula en etomoxiril-CoA por la acción de las acil-CoA sintetasas intracelulares. Después se obtienen las fracciones enriquecidas en mitocondrias y se lleva a cabo el ensayo de actividad CPT I. Para los ensayos realizados sobre fracciones mitocondriales, éstas se preincuban durante 1 min (exactamente igual para el caso del malonil-CoA) con etomoxiril-CoA y se lleva a cabo el ensayo de actividad CPT I. En este caso, el etomoxir debe ser previamente activado a etomoxiril-CoA. Esta activación ha sido descrita por nuestro grupo<sup>15</sup>.

#### 5.5 ACTIVIDAD CPT I EN PRESENCIA DE C75

El efecto del C75 se ha estudiado en cultivos celulares y en fracciones enriquecidas en mitocondrias de músculo de ratón. El C75 debe ser previamente transformado a su derivado CoA (C75-CoA) para mostrar efectos inhibitorios sobre la actividad CPT I<sup>15</sup>. Por eso, para el caso de las fracciones mitocondriales de músculo de ratón el C75 se activa, igual que el etomoxir-CoA, a C75-CoA y se lleva a cabo el ensayo de actividad CPT I de forma análoga a la descrita para el malonil-CoA y el etomoxiril-CoA. En los cultivos celulares el C75 no necesita ser previamente activado ya que esta activación ocurre en el citoplasma de la célula. Así, las células se incuban con la concentración correspondiente de C75 y el ensayo CPT I se lleva a cabo igual que se ha descrito anteriormente. Para los estudios realizados en ratón, se inyecta

---

<sup>14</sup> Zammit VA. Time-dependence of inhibition of carnitine palmitoyltransferase I by malonyl-CoA in mitochondria isolated from livers of fed or starved rats. Evidence for transition of the enzyme between states of low and high affinity for malonyl-CoA. *Biochem. J.* 218:379-386, 1984

<sup>15</sup> Bentebibel A, Sebastián D, Herrero L, Lopez-Viñas E, Serra D, Asins G, Gómez-Puertas P, Hegardt FG. A novel effect of C75 on carnitine palmitoyltransferase I activity and palmitate oxidation. *Biochemistry* 2006, In press

intraperitonealmente el C75 disuelto en medio RPMI tal y como se ha descrito en la sección 1.1, se obtienen las fracciones enriquecidas en mitocondrias y se realiza el ensayo de actividad CPT I.

## **6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD Akt/PKB**

El ensayo de determinación de la actividad Akt/PKB se basa en la inmunodetección de la proteína fosforilada en la serina 473<sup>16</sup>. La Akt/PKB es activada por la insulina en la serina 473 y utilizando un anticuerpo específico contra esta proteína fosforilada podemos determinar su nivel de activación y por lo tanto de actividad, ya que la proteína es activa cuando está fosforilada. El procedimiento completo se detalla a continuación.

### **a) Estimulación de las células por insulina**

Las células se siembran en placas de 6 pocillos a una densidad de 50.000 células por pocillo. Se crecen, diferencian e infectan tal y como se ha descrito anteriormente. El día del experimento se añade a los pocillos que corresponda 60 µl de insulina 0,2 mg/ml en 2 ml de medio sin FBS por pocillo (concentración final de 1 µM) y se incuba 10 min a 37°C.

#### Solución insulina

Se prepara una solución stock 2 mg/ml en HCl 5 mM de insulina porcina (Sigma-Aldrich, ref. I-5523). Esta solución stock se puede guardar durante 1 mes. A partir de esta solución stock se prepara una solución 10 veces diluida (0,2 mg/ml) en PBS 1X. De esta solución diluida se ponen 60 µl/pocillo en 2 ml de medio DMEM sin FBS (concentración final de 1 µM).

---

<sup>16</sup> Schmitz-Peiffer C, Craig DL, Biden TJ. Ceramide generation is sufficient to account for the inhibition of the insulin-stimulated PKB pathway in C2C12 skeletal muscle cells pretreated with palmitate. *J Biol Chem.* 1999, 274(34):24202-10.

### **b) Obtención de los extractos celulares**

Se lavan las células con PBS 1X y se añaden 40 µl de tampón de carga 1X. Se recogen las células con ayuda de una punta de pipeta, se sonicán 5 segundos y se hierven a 95°C 5 min.

### **c) Western Blot**

Las muestras se siembran en un gel de poliacrilamida al 8% y se someten a una electroforesis en condiciones desnaturalizantes. Tras la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa se procede a la inmunodetección de la proteína fosforilada mediante un anticuerpo específico tal y como se ha descrito en la sección 4.2. Tras la inmunodetección de la proteína fosforilada se realiza un *stripping* y se vuelve a hacer la inmunodetección pero en este caso contra la proteína total (fosforilada y desfosforilada). Tras la cuantificación de cada banda la actividad PKB se expresa como porcentaje de la proteína fosforilada respecto de la total.

## **7. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PKC $\theta$ Y PKC $\zeta$**

El método se basa en la inmunoprecipitación de ambas proteínas mediante el uso de anticuerpos específicos y la posterior medida de su actividad mediante un ensayo quinasa *in vitro*, usando como sustrato la proteína básica de mielina (MBP) y [<sup>32</sup>P]- $\gamma$ -ATP<sup>17</sup>. La MBP fosforilada se cuantifica después de una electroforesis en gel de poliacrilamida utilizando el sistema de escaneo Storm 840. El procedimiento completo se detalla a continuación.

### **a) Obtención de extractos celulares**

Se siembran las células en una placa de 150 mm de diámetro, se diferencian y se infectan como se ha descrito anteriormente. Se incuban las células con medio con o sin 0,25 mM palmitato durante 16 h. Se recogen las células con una espátula en 5 ml de

---

<sup>17</sup> Teruel T, Hernandez R, Lorenzo M. Ceramide mediates insulin resistance by tumor necrosis factor-alpha in brown adipocytes by maintaining Akt in an inactive dephosphorylated state. *Diabetes*. 2001, 50(11):2563-71.

PBS 1X y se homogenizan usando un homogenizador de vidrio (Wheaton) 30 veces con cada émbolo en 500  $\mu$ l de tampón de lisis con inhibidores de proteasas. Se centrifuga a 700 g 10 minutos a 4°C para bajar los núcleos y restos celulares y se guarda el sobrenadante. Se determina la concentración de proteína por el método de Bradford. Todo el proceso se realiza a 4°C.

### **b) Inmunoprecipitación**

Se coge el volumen necesario de cada extracto para tener 500-1000  $\mu$ g de proteína y se lleva al mismo volumen (~ 500  $\mu$ l) con tampón de lisis con inhibidores de proteasas. Se añaden 12,5  $\mu$ l (5  $\mu$ g/ml) de anticuerpo anti-PKC  $\theta$  (200  $\mu$ g/ml, Santacruz Biotechnologies, ref. sc-212) o anticuerpo anti-PKC  $\zeta$  (200  $\mu$ g/ml, Santacruz Biotechnologies, ref. sc-216) y se incuba durante 1 h a 4°C en un agitador orbital. Después se añaden 60  $\mu$ l de proteína A-Sepharosa 20% y se incuba toda la noche a 4°C en un agitador orbital. Después de esta incubación se centrifuga 3 min a 13.000 rpm a 4°C para bajar la proteína A- Sepharosa y se descarta el sobrenadante. Se lava 5 veces con 900  $\mu$ l de tampón de lisis sin inhibidores de proteasas. Después de cada lavado se centrifuga 1-2 min a 13.000 rpm a 4°C para bajar las bolitas de proteína A- Sepharosa y se vuelve a resuspender en tampón de lisis y se mezcla dando unos golpecitos en el tubo (no vortear).

Se hacen dos controles de inmunoprecipitación: un control llevará un anticuerpo diferente al de la PKC  $\theta$  o PKC  $\zeta$  (anti-CREB1, Santacruz Biotechnologies, ref. sc-58), y el otro llevará el anticuerpo de la PKC  $\theta$  o PKC  $\zeta$  pero no llevará extracto celular, solo tampón de lisis.

### **c) Ensayo quinasa**

Se lavan los inmunoprecipitados obtenidos en el paso anterior dos veces con 900  $\mu$ l de tampón quinasa. Después se añade al inmunoprecipitado 20  $\mu$ l de la mezcla de reacción (1  $\mu$ g MBP, 1  $\mu$ Ci [ $^{32}$ P]-  $\gamma$ -ATP y 60  $\mu$ M ATP por tubo) y se incuba 30 min a 30°C. La reacción se para añadiendo 7  $\mu$ l de tampón de carga 4X e hirviendo a 95°C 5 min. Se centrifuga 2 min a 13.000 rpm y se siembra el sobrenadante en un gel de poliacrilamida al 12 %. El gel se somete a una electroforesis en condiciones desnaturizantes y se seca en un desecador de geles. El gel seco se somete a una

autoradiografía y se cuantifica la intensidad de la banda correspondiente a la MBP (18 kDa) fosforilada usando el sistema de escáner Storm 840.

<b>Mezcla de reacción (20 µl por punto)</b>	
MBP (1 mg/ml)	1 µl
ATP 800 µM	1,5 µl
[ <sup>32</sup> P]- γ-ATP	1 µCi
Tampón quinasa c.s.p.	20 µl

Tampón de lisis: Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, EDTA 2 mM, EGTA 1 mM, PMSF 1 µM, leupeptina 25 µg/ml, aprotinina 25 µg/ml.

Se prepara sin inhibidores de proteasas y éstas se añaden en el momento del ensayo.

El tampón se prepara según la siguiente tabla:

<b>Tampón lisis (para 100 ml)</b>	
Tris/HCl 1M, pH 7,5	5 ml
NaCl	0,87 g
EDTA	0,08 g
EGTA	0,04 g
Triton X-100	1 ml

En el momento de usar añadir los inhibidores de proteasas al volumen necesario de tampón. Para 1 ml añadir: 0,1 µl PMSF 10 mM, 2,5 µl leupeptina 10 mg/ml, 2,5 µl aprotinina 10 mg/ml. Mantener en hielo.

Tampón quinasa: Tris/HCl 35 mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, EGTA 0,5 mM.

El tampón se prepara según la siguiente tabla:

Tampón quinasa (para 10 ml)	
Tris/HCl 1M, pH 7,5	350 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	0,02 g
EGTA 10 mM	0,5 ml

### Preparación de la proteína A- Sepharosa

1 g de proteína A- Sepharosa (Sigma-Aldrich, ref. P-3391) se reconstituye en 4 ml de Hepes 50 mM pH 7,2 y se deja 1 h a temperatura ambiente para que se hidrate. Pasado este tiempo se pone la suspensión en un tubo de 50 ml y se lava 4 veces con 50 ml de Hepes 50 mM. Después de cada lavado se centrifuga a 5.000 rpm a 4°C para bajar las bolitas de proteína A y se vuelve a resuspender en 50 ml de Hepes 50 mM (nunca vortear). Finalmente se diluye la proteína A- Sepharosa en 16 ml de Hepes 50 mM pH 7,2 y 0,02% azida sódica. De esta forma tenemos una suspensión al 20%.

## **8. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD $\beta$ -GALACTOSIDASA**

La actividad  $\beta$ -galactosidasa se ha determinado usando ONPG (2-nitrofenol- $\beta$ -o-galactopiranosido) como sustrato por la  $\beta$ -galactosidasa, generando un producto de reacción coloreado cuya formación podrá ser valorada midiendo la absorbancia a 420 nm.

El protocolo es el siguiente: las células se crecen en placas de 6 pocillos y se diferencian e infectan como se ha descrito anteriormente. El día del ensayo se lavan las células con PBS 1X y se añade 1 ml TEN. Las células se dejan 5 min en hielo y se recogen con la ayuda de una espátula. Se pasan las células a un tubo de 1,5 ml y se centrifugan 1 min a 5.000 rpm. Se resuspende el *pellet* obtenido en 100  $\mu$ l de Tris-HCl 0,25 M pH 7,4 y se lisan las células sometiéndolas a tres ciclos de congelación-descongelación. Tras centrifugar 5 min a 16.000 x g se toman 30  $\mu$ l del sobrenadante (extracto celular) y se pasan a otro tubo de 1,5 ml. A este tubo se añaden 270  $\mu$ l de la mezcla de reacción y se incuba 30 min a 37°C. La reacción se para añadiendo 500  $\mu$ l de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M y se mide la absorbancia a 420 nm. Para el blanco se utiliza Tris-HCl 0,25



M pH 7,4 en lugar de extracto celular y para el control positivo se añade a la mezcla de reacción 1  $\mu$ l de  $\beta$ -galactosidasa.

Mezcla de reacción	
Extracto celular	30 $\mu$ l
Solución 100 x Mg	3 $\mu$ l
ONPG 1X	66 $\mu$ l
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,1 M	201 $\mu$ l

Solución 100 x Mg :se prepara en el momento del ensayo de la siguiente manera:

Solución 100 x Mg	
MgCl <sub>2</sub> 3 M	2 $\mu$ l
$\beta$ -mercaptoetanol	20 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O destilada	38 $\mu$ l

ONPG 1X: 4 mg/ml en NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M pH 7,5

TEN: NaCl 0,1 M, Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM pH 8,0

## 9. DETERMINACIONES DEL METABOLISMO CELULAR

### 9.1 METABOLISMO DE ÁCIDOS GRASOS

#### 9.1.1. Transporte de ácidos grasos

Para evaluar el transporte de ácidos grasos al interior de la célula se ha utilizado palmitato radiactivo. El transporte de palmitato se determina midiendo la entrada de palmitato durante 2 minutos, para evitar la posterior metabolización de la molécula de ácido graso captada. El protocolo se detalla a continuación.

Las células se siembran en placas de 6 pocillos, se diferencian e infectan tal como se ha descrito anteriormente. El día del ensayo las células se lavan con 1 ml de KRBH 0,1% BSA libre de ácidos grasos, se incuban 30 min con 500  $\mu$ l de KRBH 1% BSA libre de ácidos grasos y se lavan de nuevo con 1 ml de KRBH 0,1% BSA. Después, se añade 1 ml de la mezcla de reacción por pocillo. La mezcla de reacción se prepara el mismo día del ensayo y contiene KRBH con 2,5 mM glucosa en presencia de 0,8 mM carnitina más 0,25 mM palmitato y 1  $\mu$ Ci/ml [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]palmitato unido a 1% BSA. Las cantidades de cada componente por pocillo son:

Mezcla de captación de palmitato (1 ml)	
KRBH	800 $\mu$ l
[ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]palmitato 2,5 mM	100 $\mu$ l
Glucosa 25 mM + 8 mM carnitina	100 $\mu$ l

La reacción se deja durante exactamente 2 min y pasado este tiempo se para el transporte aspirando la mezcla de reacción y añadiendo inmediatamente 1 ml de KRBH 0,5% BSA frío. Una vez parada la reacción en todos los pocillos, se aspira el KRBH 0,5% BSA y se lava con la misma solución 3 veces. Se recogen las células en 500  $\mu$ l de tampón de lisis y se determina la radiactividad incorporada de 450  $\mu$ l en un contador de centelleo. Los 50  $\mu$ l restantes se utilizan para determinar la concentración proteica por el método de Bradford.

Tampón de lisis: NaOH 0,1 N y SDS 0,1%. Para 100 ml: 1 ml NaOH 10N y 1 ml de SDS 10%

### 9.1.2. Oxidación de ácidos grasos

Para la evaluación del metabolismo de ácidos grasos se ha empleado palmitato (oxidación controlada por CPT I) y octanoato (oxidación no controlada por CPT I) marcados con  $^{14}\text{C}$ . Los ensayos de oxidación se realizan sobre células en cultivo y en ambos casos se procede de manera análoga. La oxidación de ácidos grasos se determina cuantificando la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  y la de los metabolitos ácidos solubles (ASP) que

son principalmente intermediarios del ciclo de Krebs, acetyl-CoA y palmitoilcarnitina<sup>18</sup>. Para la oxidación de palmitato se han utilizado tres métodos: uno se ha llevado a cabo en placas de 12 pocillos, otro en botellas de 25 cm<sup>2</sup> y el último en placas de 6 pocillos. Los tres se explican a continuación.

**a) Oxidación de palmitato en placas de 12 pocillos**

Este método, descrito originariamente por *Collins et al*<sup>19</sup>, permite el uso de células adheridas y el análisis de múltiples muestras. Esto es importante para el tipo de células utilizadas en este estudio ya que en métodos anteriores se necesitaba de la separación de las células de la placa, y esto provocaba la desdiferenciación y muerte de las mismas, no obteniendo buenos resultados en la oxidación.

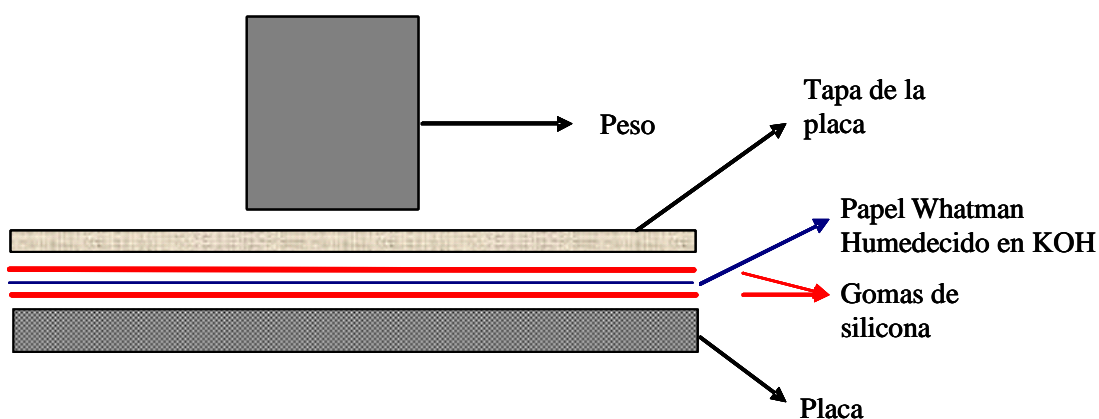
El procedimiento es el siguiente: las células se siembran en placas de 12 pocillos y se diferencian e infectan como se ha descrito anteriormente. Antes de empezar el experimento las células se lavan con 1 ml de KRBH 0,1% BSA libre de ácidos grasos, se incuban 30 min con 500 µl de KRBH 1% BSA libre de ácidos grasos en presencia o ausencia (en caso de que el experimento lo requiera) de 200 µM de etomoxir y se lavan de nuevo con 1 ml de KRBH 0,1% BSA. Después, se añaden 500 µl de la mezcla de reacción por pocillo. La mezcla de reacción se prepara el mismo día del ensayo y contiene KRBH con 2,5, 15 ó 25 mM glucosa en presencia de 0,8 mM carnitina más 0,25 mM palmitato y 1 µCi/ml [1-<sup>14</sup>C]palmitato unido a 1% BSA. Los blancos son pocillos sin células. Las cantidades de cada componente por pocillo son:

Mezcla de oxidación de palmitato (500 µl)	
KRBH	400 µl
[1- <sup>14</sup> C]palmitato 2,5 mM	50 µl
Glucosa 25, 150 ó 250 mM + 8 mM carnitina	50 µl

<sup>18</sup> Veerkamp JH, van Moerkerk TB, Glatz JFC, Zuurveld JGEM, Jacobs AEM, Wagenmakers AJ. <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> production is no adequate measure of fatty acid oxidation. *Biochem Med Metab Biol* 1986, 35:248-259

<sup>19</sup> Collins CL, Bode BP, Souba WW, Abcouwer SF. Multiwell <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-capture assay for evaluation of substrate oxidation rates of cells in culture. *BioTechniques* 1998, 24:803-808

Después de poner la mezcla de reacción en cada pocillo y de dejar un pocillo por fila libre, para evaluar la difusión del  $\text{CO}_2$  liberado en la oxidación, se procede al montaje y cierre del sistema de oxidación. El proceso se describe en figura 2. En primer lugar se coloca una pieza de goma, del tamaño de la placa, agujereada de forma que cada agujero quede centrado sobre cada pocillo. Después se coloca una pieza de papel Whatman del mismo tamaño y humedecido con  $\text{KOH}$  0,1 N y sobre ésta se coloca otra pieza de goma sin agujeros. El sistema se cierra con la tapa de la placa y se sella con Parafilm.



**Fig. 2. Sistema de oxidación de palmitato en placas de 12 pocillos.** La mezcla de oxidación de palmitato se añade a cada pocillo que tiene las células adheridas. El sistema se cierra poniendo por este orden: una goma agujereada con los agujeros centrados sobre cada pocillo, un papel Whatman mojado con  $\text{KOH}$  0,1 N, otra goma pero sin agujeros, la tapa de la placa y un peso encima para evitar las fugas de  $\text{CO}_2$ .

El montaje se deja 2-3 horas a  $37^\circ \text{C}$  en un incubador sin  $\text{CO}_2$  con un peso encima para evitar las fugas de  $\text{CO}_2$ . Durante este tiempo el  $\text{CO}_2$  producido en la oxidación pasará a través de los agujeros de la goma (actuarán como chimeneas) y quedará impregnado en el papel Whatman al reaccionar con el  $\text{KOH}$ . Para evaluar las posibles fugas de gas a través del sistema, en cada experimento se coloca una fila de la placa de 12 pocillos sin mezcla radiactiva ni células y se cuenta la radiactividad adherida al papel Whatman. Si aparece una cantidad significativa de radiactividad, el experimento se desecha debido a la presencia de difusión de gas entre pocillos.

Después del tiempo de incubación, la pieza de papel Whatman se corta en trozos correspondientes a cada pocillo, se pone en viales con 5 ml de líquido de centelleo y se

cuentan 1 min. El medio radiactivo se aspira, se lavan las células con PBS 1X y se recogen en 500 µl de tampón de lisis para determinar la concentración de proteína por el método de Bradford.

Los resultados se expresan de la siguiente forma:

$$\text{nmol palmitato} \times \text{mg}^{-1} \text{ prot} \times \text{h}^{-1} = (\text{cpm muestra} - \text{cpm blanco}) \times 125 / (\text{cpm totales} \times \text{mg prot} \times \text{h})$$

donde 125 son los nmoles de palmitato por pocillo, cpm totales son las cuentas resultantes de contar directamente 50 µl de palmitato radiactivo usado por pocillo, y h es el tiempo de incubación en horas.

### **b) Oxidación de palmitato en botellas de 25 cm<sup>2</sup>**

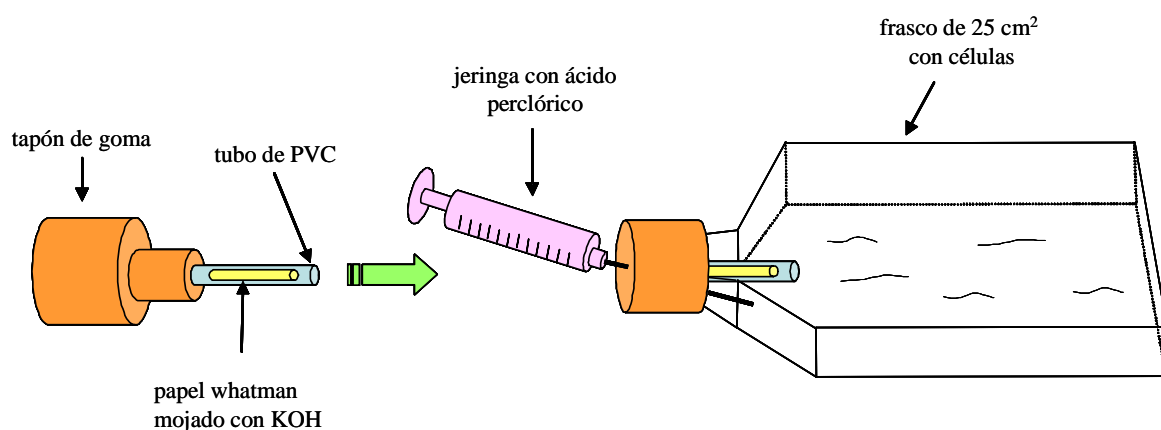
Este método ha sido descrito por *Roduit et al.*<sup>20</sup> y utiliza botellas de 25 cm<sup>2</sup> en los cuales el CO<sub>2</sub> se atrapa en un papel mojado con KOH 0,1 N. Este método representa una mejora en términos de difusión o escape de CO<sub>2</sub> pero supone un mayor gasto de células, virus y demás reactivos usados en el experimento. La reacción se para inyectando ácido perclórico en la botella. Esto tiene dos consecuencias: en primer lugar detiene la oxidación al matar a las células, y en segundo lugar acidifica el medio provocando la evaporación del bicarbonato radiactivo disuelto en el medio en forma de CO<sub>2</sub>. El hecho de añadir ácido perclórico inhabilita las células para el Bradford. Por este motivo es necesario preparar un punto extra por condición en el cual no se llevará a cabo la oxidación para realizar el Bradford. Una vez parada la reacción, el sistema aún cerrado, se deja toda la noche para permitir a todo el CO<sub>2</sub> ser captado por el papel Whatman.

El procedimiento es el siguiente: las células se crecen, diferencian e infectan tal y como se ha descrito anteriormente. El día del ensayo se procede de forma análoga al caso anterior en cuanto a los lavados y preincubaciones. Después se añaden 2 ml por botella de la mezcla radiactiva. Los blancos son botellas sin células.

---

<sup>20</sup> Roduit R, Nolan C, Alarcon C, Moore P, Barbeau A, Delghingaro-Augusto V, Przybykowski E, Morin J, Masse F, Massie B, Ruderman N, Rhodes C, Poitout V, Prentki M. A Role for the Malonyl-CoA/Long-Chain Acyl-CoA Pathway of Lipid Signaling in the Regulation of Insulin Secretion in Response to Both Fuel and Nonfuel Stimuli. *Diabetes* 2004, 53(4):1007-1019

El montaje del sistema de oxidación se detalla en la figura 3. Las botellas se sellan al principio de la incubación con un tapón de goma (tamaño 14,5, Fisher, ref.14-126BB) que lleva un tubo de PVC de 3 cm de largo (I.D. 4,7 mm, Fisher, ref. 14-169-7B) que contiene en su interior un trozo de papel Whatman mojado en KOH 0,1 N. Un extremo del tubo de PVC se envuelve en parafilm sin cubrir el lumen de manera que el tubo quede firmemente sujeto al tapón de goma. Las botellas se incuban durante 3 h en un incubador sin CO<sub>2</sub> a 37 °C.



**Fig. 3. Sistema de oxidación de palmitato en botellas de 25 cm<sup>2</sup>.** La mezcla de oxidación de palmitato se añade a cada botella que tiene las células adheridas. El sistema se cierra con un tapón de goma al cual va unido un tubo de PVC que lleva en su interior el papel Whatman mojado en KOH. Las botellas se incuban a 37°C durante 3 h.

Después de la incubación a 37 °C, la reacción se para inyectando, con una jeringa a través del tapón de goma, 0,2 ml de ácido perclórico al 40% (p/v). Se mezcla bien y se deja toda la noche a temperatura ambiente para que el CO<sub>2</sub> se capte en el papel Whatman. Al día siguiente se cogen los papeles y se cuentan en 5 ml de líquido de centelleo. Las células de las botellas para el Bradford se recogen en 1 ml de tampón de lisis.

Los resultados se expresan de la siguiente manera:

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

donde 500 son los nmoles de palmitato por botella, las cpm totales son las cuentas resultantes de contar 200  $\mu$ l del palmitato radiactivo que se pone por flascón y h es el tiempo de incubación en horas.

### **c) Oxidación de palmitato en placas de 6 pocillos**

Este último método combina las ventajas de los dos anteriores. Por un lado minimiza la difusión de gas entre pocillos y por otro es más manejable y se gastan menos reactivos que en el método de oxidación en botellas. Se trata de una modificación del método de oxidación en 12 pocillos en el que en lugar de utilizar gomas para sellar el montaje se utiliza parafilm ajustado a cada pocillo. De esta manera se minimizan las difusiones de gas entre pocillos a la vez que permite la adición del ácido perclórico para maximizar el CO<sub>2</sub> recuperado.

El tratamiento de las células es exactamente el mismo que en los casos anteriores. En este caso se añade 1 ml de mezcla radiactiva por pocillo. En cada placa se deja un pocillo que nos servirá para evaluar la difusión (de forma análoga al caso de la oxidación en placa de 12 pocillos).

El montaje del sistema de oxidación es muy parecido al caso de la oxidación en placas de 12 pocillos. En primer lugar se coloca una pieza de parafilm del tamaño de la placa con agujeros en la posición de los pocillos. Sobre cada agujero se coloca una pieza de 2 cm x 2 cm de papel Whatman mojado en KOH 0,1 N y encima se coloca otra pieza de parafilm del tamaño de la placa pero sin agujeros. El conjunto se ajusta bien a cada pocillo gracias a la flexibilidad del parafilm creando un sistema perfectamente cerrado en cada pocillo. Sobre esto se coloca una goma, la tapa de la placa y un peso encima. Se deja 3 h en un incubador a 37 °C sin CO<sub>2</sub>.

Pasado el tiempo de incubación, inyectamos a través del parafilm 100  $\mu$ l de ácido perclórico 40% y rápidamente colocamos otra pieza de parafilm sobre el pocillo y volvemos a ajustar. De esta manera el CO<sub>2</sub> que comience a desprenderse no se escapará por el agujero realizado con la jeringa. Volvemos a colocar la tapa y dejamos toda la noche para que todo el CO<sub>2</sub> quede atrapado en el papel. Debido a la adición del ácido perclórico deberemos de poner pocillos extras en los que no haremos la oxidación y servirán para la determinación de la concentración proteica por el método de Bradford. En estos pocillos se recogen las células con 500  $\mu$ l de tampón de lisis.

Los resultados se expresan de la siguiente manera:

$$\text{nmol palmitato} \times \text{mg}^{-1}\text{prot} \times \text{h}^{-1} = (\text{cpm} - \text{cpm blanco}) \times 250 / (\text{cpm totales} \times \text{mg prot} \times \text{h})$$

donde 250 son los nmoles de palmitato por pocillo, las cpm totales son las cuentas resultantes de contar 100  $\mu\text{l}$  del palmitato radiactivo que se pone por pocillo y h es el tiempo de incubación en horas.

#### **d) Oxidación de palmitato a ASP**

La oxidación de palmitato a  $\text{CO}_2$  refleja la oxidación total de la molécula de ácido graso, pero también hay moléculas de ácido graso que no han sido totalmente oxidadas y quedan productos intermediarios ácidos, o productos solubles ácidos (ASP). La medición de estos productos se realiza de siguiente manera: el ácido perclórico añadido para detener la reacción precipita el exceso de palmitato radiactivo unido a BSA, dejando los ASP en solución. Así se centrifuga 1 ml (para el caso de los botellas) o 500  $\mu\text{l}$  (para el caso de la placa de 6 pocillos) del medio de incubación a 14.000 rpm durante 10 min y se cuentan 800  $\mu\text{l}$  o 400  $\mu\text{l}$  del sobrenadante respectivamente. Los resultados se expresan de la siguiente manera:

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

para los botellas de 25  $\text{cm}^2$  o

$$\text{nmol palmitato} \times \text{mg}^{-1}\text{prot} \times \text{h}^{-1} = (\text{cpm} - \text{cpm blanco}) \times 250 \times (1.100/400) / (\text{cpm totales} \times \text{mg prot} \times \text{h})$$

para las placas de 6 pocillos

donde 500 ó 250 son los nmoles de palmitato por punto en cada caso, las cpm totales son las cuentas resultantes de contar 200 ó 100  $\mu\text{l}$  del palmitato radiactivo que se pone por punto en cada caso, 2.200/800 ó 1.100/400 es el factor de dilución en cada caso y h es el tiempo de incubación en horas.

#### **e) Oxidación de octanoato**

Para evaluar la oxidación de ácidos grasos no controlada por la la CPT I se ha escogido el ácido graso de cadena media octanoato que no necesita de la CPT I para ser transportado al interior de la mitocondria.



La oxidación de octanoato se hace exactamente igual que la de palmitato en placas de 6 pocillos con la única diferencia del ácido graso radiactivo empleado, en este caso [1-<sup>14</sup>C]-octanoato de sodio (*American Radiolabeled Chemicals*, ref. ARC-149).

Tampón de lisis: NaOH 0,1 N y SDS 0,1%. Para 100 ml: 1 ml NaOH 10N y 1 ml de SDS 10%

#### [1-<sup>14</sup>C]palmitato 2,5 mM unido a 1% BSA

Para preparar el palmitato radiactivo unido a BSA, se ponen 500 µl de [1-<sup>14</sup>C]ácido palmítico (Amersham Bisciences, ref CFA23, 250 µCi) en un tubo de 1,5 ml y se deja evaporar la solución de tolueno bajo la campana de extracción de gases. Una vez evaporado, en el mismo tubo se pesan 6,97 mg de palmitato de sodio y se disuelven en 1ml de NaOH 0,1 N calentando a 70-80 °C hasta que la solución sea transparente. Por otro lado se disuelve 1 g BSA libre de ácidos grasos (Sigma-Aldrich, ref. A-6003) en 8 ml de NaCl 0,9 %. Se mantiene esta solución a 45-50 °C. Una vez la solución de palmitato es transparente, se añade gota a gota sobre la solución de BSA y se va agitando lentamente. De esta forma conseguimos que el palmitato se conjugue con la albúmina. La solución resultante se filtra a través de un filtro de 0,45 µm y se guarda en alícuotas de 1 ml a -20 °C.

#### [1-<sup>14</sup>C]octanoato 2,5 mM unido a 1% BSA

El octanoato radiactivo se prepara exactamente igual que el palmitato tal y como se ha explicado anteriormente.

#### Glucosa 25, 150 o 250 mM más carnitina 8 mM

Se mezclan 250 µl, 1,5 ml ó 2,5 ml de glucosa 1M con 16 mg de carnitina y se disuelve en KRBH hasta 10 ml. Se hacen alícuotas de 1 ml y se guarda a -20 °C.

### **9.1.3. Incorporación de ácidos grasos a lípidos intracelulares**

En este experimento se evalúa la incorporación de palmitato a las diferentes especies lipídicas intracelulares. Para ello se siembran células en placas de 6 pocillos y se diferencian e infectan con los adenovirus tal y como se ha descrito anteriormente. La células se incuban con medio DMEM sin FBS (medio de infección) conteniendo 0,25 mM [1-<sup>14</sup>C]palmitato unido a 1% BSA (es el mismo palmitato radiactivo que el usado

en los experimentos de oxidación) durante 16 h. Pasado este tiempo se extraen los lípidos de las células y se separan mediante una cromatografía en capa fina o TLC, que posteriormente se cuantifica utilizando el sistema de escaneo Storm 840. Los diferentes lípidos analizados han sido los triglicéridos (TG), fosfolípidos (PL), diacilglicerol (DAG) y palmitato no esterificado (PalNE). El procedimiento se detalla a continuación:

#### a) Incubación con [1-<sup>14</sup>C]palmitato

Las células se crecen, diferencian e infectan tal y como se ha descrito anteriormente. La tarde antes del día del experimento, se quita el medio de infección, se lava con PBS 1X y se añade 1 ml de medio nuevo sin FBS y 0,25 mM [1-<sup>14</sup>C]palmitato unido a 1% BSA por pocillo. Dejamos este medio 16 h hasta la mañana siguiente.

#### b) Extracción de los lípidos

Después del periodo de incubación con el palmitato se lavan las células con PBS 1X y se añade 1 ml de metanol:PBS (2:3, v/v) por pocillo. Las células se recogen con la ayuda de una espátula y se centrifugan a 2.000 rpm 5 min. El *pellet* se lava con 1 ml de PBS 1X y se centrifuga de nuevo a 2.000 rpm 5 min. Se añaden 200 µl de NaCl 0,2 M al *pellet* y se congela inmediatamente en N<sub>2</sub> líquido. Una vez las células se hayan descongelado, se toma una alícuota para determinar la concentración de proteína por el método de Bradford. Con el resto de células lisadas se procede a la extracción de los lípidos. Para ello se añade 700 µl de reactivo de Folch<sup>21</sup> (cloroformo:metanol, 2:1) y 50 µl de KOH 0,1 M y se vortea vigorosamente (tres pulsos de 10 s). Las dos fases se separan centrifugando a 2.000 x g 5 min. La fase acuosa superior se descarta y la fase inferior se lava con 200 µl de metanol:agua:cloroformo (48:47:3) vortea vigorosamente y centrifugando de nuevo a 2.000 x g 5 min. Se recoge la fase orgánica inferior y se pasa a otra serie de tubos. Se deja evaporar bajo una corriente de N<sub>2</sub> o en el *speed-vac*.

#### c) Separación de los lípidos por cromatografía en capa fina (TLC)

Los lípidos totales obtenidos en el paso anterior se disuelven en 30 µl de cloroformo y se siembran en una capa fina de gel de sílice (HPTLC Silica gel 60,

---

<sup>21</sup> Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 1957, 226(1):497-509

Merck, ref. 5547) para su separación cromatográfica. El solvente utilizado para las separación es hexano:dietiléter:ácido acético (70:30:1, v/v/v)<sup>22</sup>. Después de que la cromatografía haya llegado a su fin, las placas se dejan secar al aire y se ponen a contactar con la pantalla del Storm 840 durante toda la noche para la posterior cuantificación de cada banda. Los datos son expresados como unidades ópticas por  $\mu\text{g}$  de proteína.

Los patrones de migración obtenidos de Sigma-Aldrich se preparan a una concentración de 2 mg/ml en cloroformo:etanol (2:1, v/v). Los patrones utilizados han sido: fosfatidil-serina (ref. P-5660), dipalmitoilglicerol (ref. D-9135), y tripalmitoilglicerol (ref. T-5888). Estos patrones se corren en la capa fina y se revelan con vapores de  $\text{I}_2$ . Debido a que estos lípidos complejos son rápidamente oxidados, todas las soluciones de los patrones se preparan recientes y se guardan bajo una atmósfera de  $\text{N}_2$  a  $-20^\circ\text{C}$ .

El solvente utilizado para la separación cromatográfica es un solvente apolar (hexano:dietiléter:ácido acético) por lo cual los lípidos apolares migrarán más que los lípidos polares. Los  $R_f$  de los lípidos cuantificados en este estudio son: PL 0,09, DAG 0,12, palNE 0,27 y TG 0,66, siguiendo este orden de menos apolar a más apolar.

## 9.2 METABOLISMO DE GLUCOSA

### 9.2.1. Transporte de glucosa

Para evaluar el transporte de glucosa a través de la membrana plasmática de la célula se ha utilizado un análogo no metabolizable, la 2-deoxiglucosa, consiguiendo así evaluar únicamente el transporte y no la posterior metabolización de la molécula de glucosa que entra en la célula<sup>23</sup>. El procedimiento general se detalla a continuación.

Las células se siembran en placas de 6 pocillos a una densidad de 50.000 células por pocillo. Se crecen, diferencian e infectan tal y como se ha descrito anteriormente. El

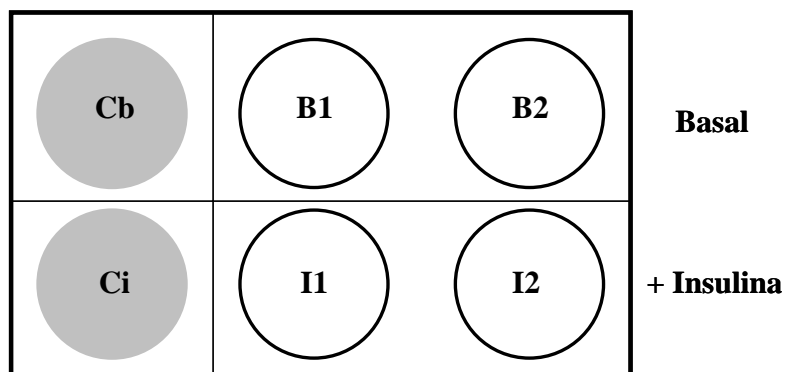
---

<sup>22</sup> Montell E, Turini M, Marotta M, Roberts M, Noé V, Ciudad CJ, Macé K, Gómez-Foix AM. DAG accumulation from saturated fatty acids desensitizes insulin stimulation of glucose uptake in muscle cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2001, 280:E229-E237

<sup>23</sup> Kaliman P, Vinals F, Testar X, Palacin M, Zorzano A. Disruption of GLUT1 glucose carrier trafficking in L6E9 and Sol8 myoblasts by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor wortmannin. *Biochem. J.* 1995, 312, 471-477

día del experimento se añade a los pocillos que corresponda 60  $\mu$ l de insulina 0,2 mg/ml en 2 ml de medio sin FBS por pocillo (concentración final de 1  $\mu$ M) y se incuba 30 min a 37°C. Pasado este tiempo se aspira el medio y se lava 2 veces con 5 ml de tampón de transporte atemperado a 37°C. Después se añade 1 ml de la solución radiactiva en tampón de parada para los blancos y 1 ml de solución radiactiva en tampón de transporte para los demás pocillos. Las dos soluciones se añaden cada 15 s y se dejan durante 10 min. Pasado este tiempo se para el transporte con 2 ml de tampón de parada frío y se lavan los pocillos dos veces con el mismo tampón de parada. Se recogen las células en 1 ml de tampón de lisis y se ponen 200  $\mu$ l en un vial con 5 ml de líquido de centelleo y se mide la radiactividad obtenida. Se preparan también dos viales control para conocer la radiactividad total de cada solución radiactiva (en tampón de transporte y en tampón de parada). Para ello se cogen 30  $\mu$ l de cada una y ponen en un vial con 5 ml de líquido de centelleo. Se toma otra alícuota de las células en tampón de lisis para medir la concentración de proteína por el método de Bradford.

Cada placa se distribuye tal y como se indica en la figura 4. Cb y Ci son los pocillos controles que servirán como blancos (Cb=control basal, Ci=control insulina) ya que la incubación es con tampón de parada en el cual no se dará transporte de glucosa. B1, B2 (basal 1 y 2) e I1, I2 (insulina 1 y 2) son los puntos dobles para el transporte basal de glucosa y el estimulado por insulina. Así el transporte basal de glucosa se obtiene de restar Cb de los puntos B1 y B2 y el transporte estimulado por insulina de restar Ci de los puntos I1 e I2.



**Fig. 4. Esquema de transporte de glucosa en placas de 6 pocillos.** En cada pocillo se pone 1 ml de la solución radiactiva, en tampón de parada para los controles (Cb y Ci) o en tampón de transporte para los demás pocillos (B1,B2, I1 y I2). Las soluciones se dejan 10 min y el transporte se para con 2 ml de tampón de parada.

Los resultados se expresan de la siguiente forma:

$$\text{pmol 2-deoxiglucosa} \times \text{mg prot}^{-1} \times 10 \text{ min}^{-1} = (\text{cpm} - \text{cpm blanco}) \times 15.000 / (\text{CT} \times \text{mg prot})$$

donde CT son las cuentas totales de 30  $\mu\text{l}$  de las soluciones radiactivas (en tampón de parada o transporte), cpm son las cuentas de cada punto y 15.000 es un factor que proviene de tener en cuenta los pmoles de 2-deoxiglucosa totales y el factor de dilución.

Tampón de transporte: NaCl 137 mM, KCl 4,7 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,2 mM,  $\text{MgSO}_4$  1,2 mM,  $\text{CaCl}_2$  2,5 mM, Hepes 20 mM pH 7,4, y piruvato de sodio 2 mM.

El tampón se prepara en el momento del ensayo según la siguiente tabla:

Tampón de transporte (para 100 ml)	
Solución A	5 ml
Solución B	1ml
Solución C	1 ml
Hepes	0,47 g
Piruvato de sodio	22 mg
$\text{H}_2\text{O}$ destilada c.s.p.	100 ml

donde:

Solución A: NaCl 2,47 M

Solución B: KCl 0,47 M,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,12 M,  $\text{MgSO}_4$  0,12 M

Solución C:  $\text{CaCl}_2$  0,25 M

Primero se pesa el Hepes y el piruvato de sodio y se ajusta el pH a 7,4. Después se añaden los volúmenes correspondientes de las soluciones A, B y C. Las soluciones A, B y C se tienen preparadas y guardadas a 4°C. Una vez preparado, la solución de transporte se mantiene a 37°C hasta su uso.

Tampón de parada: glucosa 50 mM en PBS 1X.

Se pesan 0,901 g de glucosa por cada 100 ml de tampón. Se guarda y se usa a 4°C.

Solución radiactiva: 2-deoxiglucosa 100  $\mu$ M, 2-deoxi-D-[2,6-<sup>3</sup>H]glucosa (Amershan Biosciences, ref. TRK672) 1 $\mu$ Ci/ml. Se prepara según la siguiente tabla:

<b>Solución radiactiva (para 10 ml)</b>	
2-deoxiglucosa 10 mM	100 $\mu$ l
2-deoxiglucosa- <sup>3</sup> H	10 $\mu$ l
tampón de parada (a 4°C) o tampón de transporte (a 37°C)	9,89 ml

Solución de lisis: NaOH 0,1 N y SDS 0,1%.

Para 100 ml: 1 ml NaOH 10 N y 1 ml de SDS 10%

#### Solución insulina

Se prepara una solución stock 2 mg/ml en HCl 5 mM de insulina porcina (Sigma-Aldrich, ref. I-5523). Esta solución stock se puede guardar durante 1 mes. A partir de esta solución stock se prepara una solución 10 veces diluida (0,2 mg/ml) en PBS 1X. De esta solución diluida se ponen 60  $\mu$ l/pocillo en 2 ml de medio DMEM sin FBS (concentración final de 1  $\mu$ M).

#### **9.2.2. Síntesis de glucógeno**

La síntesis de glucógeno se evalúa midiendo la incorporación de glucosa radiactiva a glucógeno<sup>16</sup>. Para ello se siembran las células en placas de 6 pocillos y se diferencian e infectan tal y como se ha descrito anteriormente. La síntesis de glucógeno al igual que el transporte de glucosa se evalúa tanto en situación basal como estimulada por insulina. De esta forma evaluamos también la capacidad de respuesta de la célula a la insulina, es decir, la sensibilidad a la insulina. El procedimiento general se detalla a continuación.

Las células se incuban durante 1 h en 500  $\mu$ l de medio sin FBS que contiene 4  $\mu$ Ci/ml D-[U- $^{14}$ C]-glucosa (Amersham Biosciences, ref. CFB96) y en presencia o ausencia de insulina 1  $\mu$ M (15  $\mu$ l/pocillo insulina 0,2 mg/ml). Pasado este tiempo se lavan las células 3 veces con 2 ml de PBS 1X frío y se recogen en 300  $\mu$ l de KOH 1 M con la ayuda de una espátula. Tras incubar las células recogidas 10 min a 100°C se toma una alícuota para hacer el Bradford. En el resto de las células se precipita el glucógeno añadiendo 40  $\mu$ l de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> saturado y 700  $\mu$ l de acetona fría. Se deja 30 min a -70°C para que precipite todo el glucógeno y se centrifuga a 16.000 x g durante 10 min. Se descarta el sobrenadante y se resuspende el *pellet* en 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O mQ. Se añaden 500  $\mu$ l de acetona fría y se vuelve a centrifugar a 16.000 x g 10 min. El *pellet* resultante se resuspende en 100  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O mQ y se pone en un vial con 5 ml de líquido de centelleo para su posterior contaje.

Los resultados se expresan de la siguiente forma:

$$\text{nmol glucosa incorporada a glucógeno x mg prot}^{-1} \text{ x h}^{-1} = (12.500 \text{ x cpm}) / (\text{CT x mg prot x h})$$

donde 12.500 son los nmoles de glucosa totales por pocillo, cpm son las cuentas de cada punto y CT son las cuentas totales resultantes de contar el volumen de D-[U- $^{14}$ C]-glucosa que se pone por pocillo.

## 10. DETERMINACIÓN DE METABOLITOS

### 10.1. DETERMINACIÓN DE TRIGLICÉRIDOS

La determinación del contenido en triglicéridos se basa en la extracción de los lípidos celulares y su posterior hidrólisis a glicerol y ácidos grasos y la cuantificación del glicerol liberado. Para ello se usa el kit *Triglyceride (GPO-Trinder)* (Sigma-Aldrich, ref. A-337) que permite la cuantificación de los triglicéridos midiendo la absorbancia a 540 nm. El procedimiento se detalla a continuación.

**a) Incubación con palmitato**

Se incuban las células 16 h en medio DMEM sin FBS con 0,25 mM palmitato tal y como se ha descrito en tratamientos celulares (sección 2.4).

**b) Extracción de lípidos**

El procedimiento es exactamente igual que el detallado para la incorporación de palmitato a lípidos intracelulares. Los extractos lipídicos se disuelven en 50 µl de tert-butanol/metanol:tritón X-100 (1:1) 3/2, debido a que disueltos en esta solución no se observan interferencias en el ensayo de cuantificación.

**c) Cuantificación de triglicéridos**

Los triglicéridos se cuantifican enzimáticamente utilizando el kit *Triglyceride (GPO-Trinder)* siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente el método consiste en la hidrólisis de los triglicéridos por acción de la lipoproteína lipasa a glicerol y ácidos grasos libres. El glicerol producido es usado por una serie de reacciones enzimáticas acopladas catalizadas por la glicerol quinasa, glicerol fosfato oxidasa y peroxidasa. Este kit diferencia entre el glicerol libre presente en las células del producido por la hidrólisis de los triglicéridos, permitiendo cuantificar los triglicéridos reales. El producto de la última reacción enzimática presenta una absorbancia a 540 nm y el incremento en la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de triglicéridos presente en la muestra.

**10.2. DETERMINACIÓN DE CERAMIDAS Y DIACILGLICEROL**

Para la determinación del diacilglicerol (DAG) y las ceramidas se ha utilizado el kit sn-1,2-Diacilglicerol Biotrak (Amersham Biosciences, ref. RPN 200). Este kit permite la determinación cuantitativa tanto del DAG como de las ceramidas. La base de este método es un ensayo radioenzimático que utiliza el enzima DAG quinasa de *E. coli* que convierte cuantitativamente el DAG en [<sup>32</sup>P]-ácido fosfatídico en presencia de [<sup>32</sup>P]-γ-ATP. Además esta enzima es también activa con las ceramidas, aunque con menor actividad, convirtiéndolas en ceramida-1-fosfato. Después de una serie de etapas de extracción para eliminar el ATP radiactivo en exceso, las especies fosforiladas se separan mediante cromatografía en capa fina (TLC) y se cuantifican utilizando el sistema de escaneo Storm 840. El procedimiento detallado se explica a continuación:



**a) Incubación con palmitato**

La incubación con palmitato es exactamente igual que la explicada para la determinación de TG.

**b) Preparación de las muestras**

El procedimiento es exactamente igual que el detallado para la incorporación de palmitato a lípidos intracelulares. Los extractos deben ser obtenidos en tubos de 1,5 ml con tapón de rosca, debido a que en posteriores etapas será necesario hacer extracciones con cloroformo vorteados vigorosamente y de esta forma evitaremos la pérdida de muestra. Una vez obtenidos, los extractos lipídicos pueden guardarse a  $-20^{\circ}\text{C}$  bajo una atmósfera de nitrógeno durante varios días hasta el momento del ensayo.

**c) Preparación de los reactivos**

Seguimos las instrucciones dadas por el fabricante. Brevemente, el kit se compone de los siguientes reactivos: el enzima (preparación membranosa de *E.coli* enriquecida en DAG quinasa), diluyente de la enzima (imidazol/HCl 0,01 M, ácido dietilentriamino-pentaacético (DETAPAC) pH 6,6), tampón de ensayo (imidazol/HCl 0,1 M pH 6,6, NaCl 0,1 M,  $\text{MgCl}_2$  25 mM, EGTA 2 mM), y solución de detergente (n-octil- $\beta$ -glucopiranosido 7,5 % (w/v), cardiolipina 5 mM en 1 mM DETAPAC). Todos estos reactivos se guardan a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se descongelan en el momento del ensayo, dejándolos atemperar a temperatura ambiente. El enzima se mantiene en hielo y debe diluirse 1/1 con el diluyente del enzima. La solución de detergente es sensible a la luz y la temperatura así que se mantiene en hielo y protegida de la luz. Además esta solución debe guardarse siempre bajo una atmósfera de nitrógeno.

Además de los reactivos ya preparados del kit, hemos de preparar la solución de marcaje, es decir, la solución de ATP radiactivo que servirá para iniciar la reacción. Esta solución debe ser 5 mM ATP con  $1\ \mu\text{Ci}$  [ $^{32}\text{P}$ ]- $\gamma$ -ATP (Amersham Biosciences, ref. PB108) por punto (10  $\mu\text{l}$ ). Para ello se disuelven 6,05 mg de ATP (disodio sal) en 2 ml de una solución 100 mM Imidazol/HCl y 1 mM DETAPAC, pH 6,6. Esto da una disolución 5 mM de ATP. La concentración de esta disolución debe ser comprobada midiendo la absorbancia a 259 nm ( $\epsilon_{259} = 15,4 \times 10^3\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$ ) de una dilución 1/40 en imidazol/HCl con 1 mM de DETAPAC. Con este valor calcularemos la cantidad de ATP por tubo (tienen que ser 10  $\mu\text{l}$  de ATP 5 mM) y haremos la mix para todos los tubos. 2 ml de ATP 5 mM son suficientes para 150 ensayos. Después calculamos la

cantidad correcta de ATP radiactivo que hemos de añadir para tener 1  $\mu\text{Ci}$  por punto, teniendo en cuenta el factor de decaimiento de su actividad. Para calcular la actividad específica del ATP el día del ensayo utilizamos la tabla que suministra el protocolo del kit. Dividiendo este valor entre la actividad específica del ATP dada por el comercial en un día de referencia calculamos el factor de decaimiento. Teniendo en cuenta este factor calculamos la cantidad de  $\mu\text{Ci}$  totales de ATP radiactivo en el vial original el día del ensayo. El ensayo requiere 1,0  $\mu\text{Ci}$  de ATP por tubo. Calculamos la cantidad total teniendo en cuenta el número de tubos. Añadimos esta cantidad al ATP frío 5 mM y mezclamos vorteadando. Añadir la cantidad necesaria de esta mezcla a cada tubo para que haya 1  $\mu\text{Ci}$  por tubo.

Una vez atemperados y preparados todos los reactivos, preparamos la mezcla de reacción, que contiene el enzima diluido, el tampón de ensayo y ditioneitol (DTT). La mezcla se prepara según la siguiente tabla:

<b>Mezcla de reacción (70 <math>\mu\text{l}</math> por punto)</b>	
Enzima diluido	10 $\mu\text{l}$
Tampón de ensayo	50 $\mu\text{l}$
DTT 0,02 M	10 $\mu\text{l}$

#### **d) Protocolo del ensayo**

Primero se disuelven los extractos lipídicos en 20  $\mu\text{l}$  de solución de detergente y se sonica 2 min en un baño sonicador. Se añaden 70  $\mu\text{l}$  de mezcla de reacción por tubo y se inicia la reacción añadiendo 10  $\mu\text{l}$  de solución de marcaje (ATP radiactivo) por tubo e incubando 30 min a 25°C. Pasado este tiempo se para la reacción añadiendo 20  $\mu\text{l}$  de ácido perclórico 1% (v/v) y 450  $\mu\text{l}$  de cloroformo:metanol (1:2, v/v). Se vortea y se deja 10 min a temperatura ambiente. Pasados los 10 min se centrifugan los tubos a 2.000 x g 1 min. Se añaden entonces 150  $\mu\text{l}$  de ácido perclórico y 150  $\mu\text{l}$  de cloroformo. Se tapan los tubos y se vortea vigorosamente para extraer los lípidos. Este proceso es crucial ya que queremos separar las especies lipídicas del exceso de ATP radiactivo. Para aumentar la eficiencia se vortea haciendo 3 pulsos de 5 segundos. Se centrifuga de nuevo como antes para separar las dos fases. La fase acuosa superior (donde estará ATP radiactivo que no ha reaccionado) se descarta y se lava la fase inferior con 1 ml de ácido perclórico 1%. Se centrifuga de nuevo y se vuelve a descartar la fase superior. Se repite

este proceso otra vez. Se recoge fase inferior y se pone en otra serie de tubos. Se evapora el cloroformo en el *speed-vac* y se redisuelven las muestras en 20  $\mu$ l de cloroformo:metanol 95:5 (v/v).

#### e) Separación cromatográfica (TLC)

Se siembran las muestras en media placa fina de gel de sílice (HPTLC Silica gel 60, Merck, ref. 5547) y se someten a la cromatografía en el solvente cloroformo/acetona/metanol/ácido acético/agua (10:4:3:2:1). La placa de sílice debe de estar activada previamente remojándola con acetona y secada al aire inmediatamente antes de usarla. El solvente debe prepararse antes de su uso para una mejor separación cromatográfica. Una vez acabada la cromatografía se saca la placa y se deja secar al aire. Se cuantifica la intensidad de cada banda utilizando el sistema de escaneo Storm 840 después de dejar contactar toda la noche. Los resultados se expresan como unidades ópticas arbitrarias. Con el solvente utilizado el DAG tiene un  $R_f$  de 0,8 y las ceramidas de 0,6.

## 11. ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Los espectros de MALDI-TOF del C75, C75-CoA, etomoxir y etomoxiril-CoA se han obtenido en un espectrómetro de masas Voyager DE-RP (Applied Biosystems) equipado con un láser de nitrógeno (337 nm, pulso de 3 ns). El voltaje de aceleración se fija a 20 kV. Los datos se adquieren en el modo reflector con tiempos de 320 ns tanto para la polaridad negativa como la positiva. Los espectros se calibran externamente usando como mezcla de calibración (mezcla de calibración 1, Applied Biosystems): CHCA, des-Arg<sup>1</sup>-Bradykinina, Angiotensina I, Glu<sup>1</sup>-Fibrinopeptido B, Neurotensina m/z 300-1700.

Las muestras se preparan diluyendo 1  $\mu$ l de la mezcla de activación del C75 o etomoxir a C75-CoA o etomoxiril-CoA respectivamente con 100  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O y mezclando 1  $\mu$ l de esta solución diluida con 1  $\mu$ l de la solución matriz (10 mg/ml de ácido 2,5-dihidroxibenzoico (2,5-DHB, Aldrich) en metanol:agua 1:1). 1  $\mu$ l de la mezcla muestra:matriz se pone en una placa de acero, se deja secar al aire y se introduce

en el espectrómetro de masas. Los espectros se adquieren en el modo positivo y negativo.

Los espectros de MALDI-TOF han sido realizados por el servicio de espectrometría de masas de la Universidad de Barcelona (SCT).

## **RESULTADOS**



## RESULTADOS

### 1. EFECTO DE LA SOBREENPRESIÓN DE L-CPT I EN LA RESISTENCIA A LA INSULINA INDUCIDA POR ÁCIDOS GRASOS EN MÚSCULO ESQUELÉTICO

Con el objetivo de comprobar si un aumento en la oxidación de ácidos grasos puede proteger contra la resistencia a la insulina ocasionada por la acumulación de metabolitos derivados de ácidos grasos en músculo esquelético, se ha sobreexpresado la LCPT I, enzima que regula su oxidación, en células de músculo esquelético de rata L6E9.

#### 1.1. TRANSDUCCIÓN DE CÉLULAS L6E9

Para la sobreexpresión de la LCPT I se ha utilizado la tecnología de adenovirus recombinantes. Los adenovirus utilizados en este trabajo fueron: Ad-LacZ, Ad-LCPT I wt y Ad-LCPT I M593S. Tanto el adenovirus Ad-LCPT I wt<sup>1</sup> como el adenovirus Ad-LCPT I M593S<sup>2</sup> fueron previamente obtenidos en nuestro grupo. El adenovirus Ad-LacZ se utilizó como control de infección.

Los stocks de adenovirus se amplificaron utilizando células HEK 293 tal y como se ha descrito en Materiales y Métodos (sección 3.2). Los adenovirus se obtuvieron con un título de  $2,3 \times 10^9$  pfu/ml para el Ad-LacZ,  $1 \times 10^{10}$  pfu/ml para el Ad-LCPT I wt y  $1,5 \times 10^9$  pfu/ml para el Ad-LCPT I M593S.

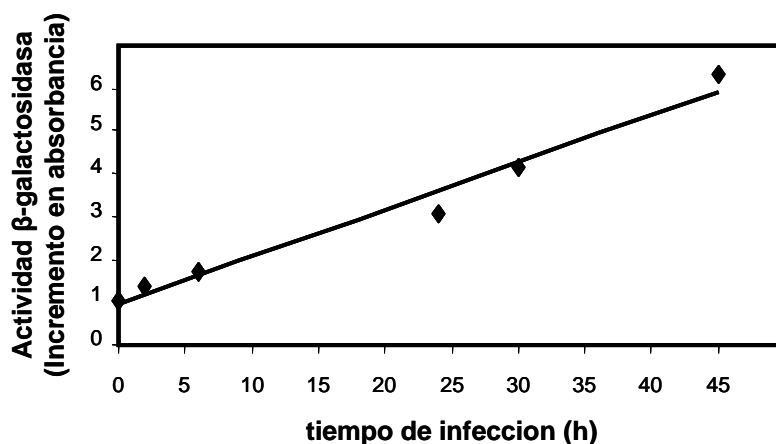
Para establecer las mejores condiciones de transducción de las células L6E9 por estos virus, se hizo un primer experimento variando el tiempo de infección. Para ello se

---

<sup>1</sup> Rubi B, Antinozzi PA, Herrero L, Ishihara H, Asins G, Serra D, Wollheim CB, Maechler P, Hegardt FG. Adenovirus-mediated overexpression of liver carnitine palmyltransferase I in INS-1E cells: effects on cell metabolism and insulin secretion. *Biochem. J.* (2002) 219-226

<sup>2</sup> Herrero L, Rubi B, Sebastián D, Serra D, Asins G, Maechler P, Prentki M, Hegardt FG. Alteration of the malonyl-CoA/carnitine palmitoyltransferase I interaction in the  $\beta$ -cell impairs glucose-induced insulin secretion. *Diabetes* 2005, 54:462-471

infectaron las células con una cantidad constante de virus Ad-LacZ (80 pfu/cel) durante 2, 6, 24, 30 y 45 horas y se midió la actividad  $\beta$ -galactosidasa al final del periodo de infección. Los resultados se muestran en la figura 1.



**Fig. 1. Actividad  $\beta$ -galactosidasa en células L6E9 infectadas con Ad-LacZ.** Las células se infectaron con 80 pfu/cel tal y como se ha descrito en Materiales y Métodos durante diferentes tiempos y se realizó el ensayo de actividad  $\beta$ -galactosidasa. Los resultados se expresan como el incremento de la absorbancia respecto el control sin infección.

Tal y como se muestra en la figura, la actividad  $\beta$ -galactosidasa codificada por el Ad-LacZ aumentó linealmente con el tiempo, indicando que en estas células la capacidad de infección aumentaba con el tiempo y no había efecto de saturación hasta como mínimo 45 horas tras la infección. Se escogió como tiempo de infección para los posteriores experimentos 30 horas, ya que a partir de este tiempo la mortalidad celular empezaba a notarse significativamente.

## **1.2. ACTIVIDAD CPT I EN CÉLULAS L6E9 INFECTADAS CON Ad-LCPT I wt Y Ad-LCPT I M593S**

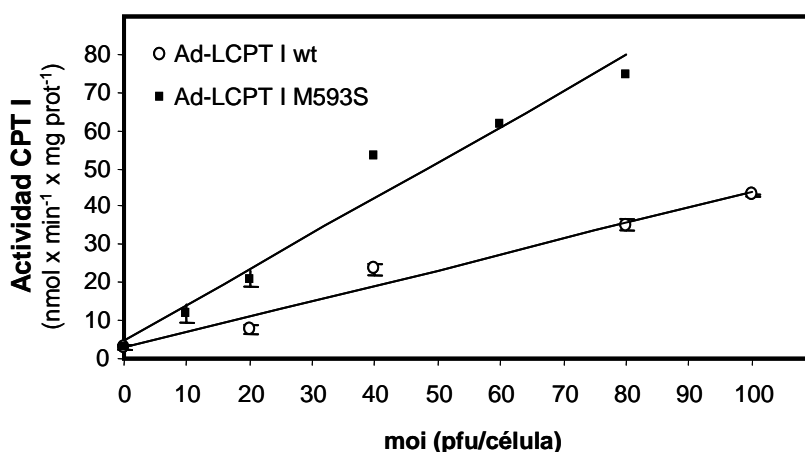
### **1.2.1. Actividad CPT I en células L6E9 infectadas con diferentes cantidades de Ad-LCPT I wt y Ad-LCPT I M593S**

Para estudiar la variación de la actividad CPT I en función de la cantidad de virus utilizada así como determinar la cantidad de virus necesaria para provocar el



mismo aumento en la actividad CPT I con los virus Ad-LCPT I wt y Ad-LCPT I M593S, la actividad CPT I se analizó con detalle.

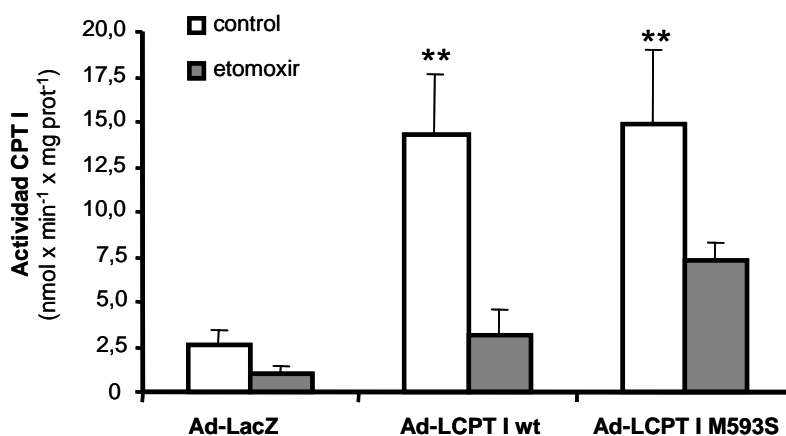
Las células se infectaron con diferentes cantidades de Ad-LCPT I wt y Ad-LCPT I M593S (fig.2) y se determinó la actividad CPT I en 10  $\mu$ g de proteína obtenida de fracciones enriquecidas en mitocondrias. En ambos casos la actividad CPT I incrementó linealmente con la cantidad de virus usada sin llegar a una saturación.



**Fig. 2. Actividad CPT I en células L6E9 infectadas con diferentes cantidades de Ad-LCPT I wt y Ad-LCPT I M593S.** Las células se infectaron con diferentes pfu/cel de Ad-LCPT I wt o Ad-LCPT I M593S durante 30 h. Después se obtuvieron fracciones enriquecidas en mitocondrias y se realizó en ensayo de actividad CPT I con 10  $\mu$ g de proteína. Los datos son la media  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes realizados en duplicado.

Para comprobar que la cantidad de virus que producía un aumento de 6 veces en la actividad CPT I, deducida a partir del experimento anterior, causaba realmente este incremento, las células se infectaron con esta cantidad de virus (40 pfu/cel para el Ad-LCPT I wt y 20 pfu/cel para el Ad-LCPT I M593S) y se determinó la actividad CPT I en 10  $\mu$ g de proteína obtenida de fracciones enriquecidas en mitocondrias. La infección con estas cantidades de virus provocó un aumento de 6 veces en la actividad CPT I, consistente con el experimento anterior. Para comprobar que este incremento en la actividad CPT era debido exclusivamente a la CPT I se incubaron las células 30 min en presencia o ausencia de 200  $\mu$ M etomoxir, un inhibidor de la CPT I. La concentración de etomoxir fue escogida como la cantidad necesaria para inhibir completamente la actividad CPT I (fig. 3). En todos los casos el etomoxir causó una inhibición de la actividad CPT I. Se observa también que el etomoxir fue capaz de inhibir, aunque en

menor cantidad, la actividad CPT I en aquellas células que sobreexpresan la forma mutada insensible a malonil-CoA de CPT I.

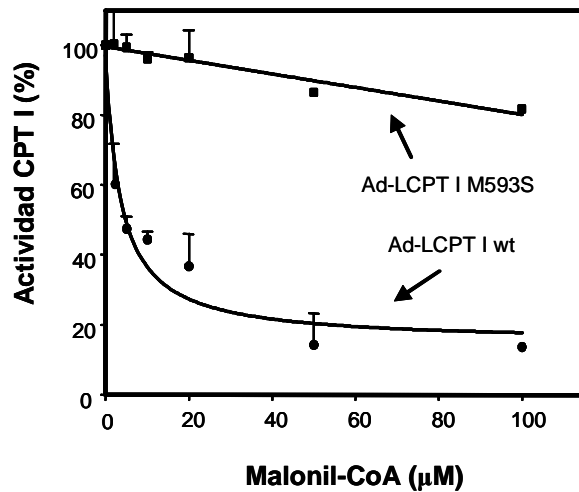


**Fig. 3. Actividad CPT I en células L6E9 infectadas con Ad-LCPT I wt y Ad-LCPT I M593S.** Las células L6E9 se infectaron con los tres virus y se incubaron 30 min con o sin etomoxir en KRBH 1% BSA. Se obtuvieron las fracciones enriquecidas en mitocondrias y se determinó la actividad CPT I. Los datos son la media  $\pm$  SD de 4 experimentos independientes. \*\* $P < 0,001$  respecto Ad-LacZ.

Así el uso de adenovirus permite una eficiente sobreexpresión de la actividad CPT I en estas células. Además esta actividad CPT I sobreexpresada retiene sus características fisiológicas puesto que es inhibida por su inhibidor farmacológico etomoxir, tanto para el caso de la LCPT I wt como para el caso de la LCPT I M593S.

### 1.2.2. Inhibición de la actividad CPT I por malonil-CoA en células L6E9 infectadas con Ad-LCPT I wt y Ad-LCPT I M593S

Con el objetivo de evaluar la capacidad de inhibición del malonil-CoA sobre la actividad CPT I en células que sobreexpresan la forma mutada de la CPT I, células L6E9 se infectaron con Ad-LCPT I wt o Ad-LCPT I M593S tal y como se ha descrito en Materiales y Métodos y se determinó la actividad CPT I en fracciones enriquecidas en mitocondrias en presencia de diferentes concentraciones de malonil-CoA (fig. 4).

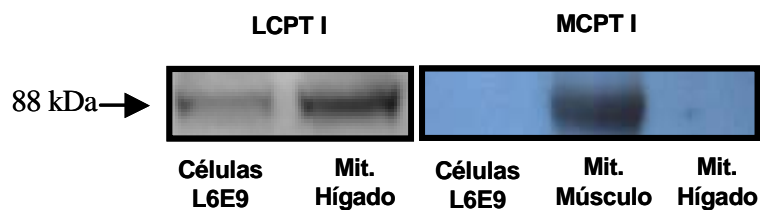


**Fig. 4. Inhibición de la actividad CPT I en células L6E9 infectadas con Ad-LCPT I wt y Ad-LCPT I M593S.** Las células se infectaron con Ad-LCPT I wt o Ad-LCPT I M593S y se determinó la actividad CPT I en fracciones enriquecidas en mitocondrias en presencia de diferentes concentraciones de malonil-CoA. Los resultados se expresan como porcentaje respecto a la actividad CPT I sin malonil-CoA y son la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes.

Como se muestra en la fig. 4 en presencia de 100  $\mu$ M de malonil-CoA las células infectadas con Ad-LCPT I M593S retuvieron el 80% de la actividad CPT I mientras que en las células infectadas con Ad-LCPT I wt la actividad CPT I se inhibió un 80%. Así la LCPT I M593S fue activa en células L6E9 incluso a concentraciones altas de malonil-CoA, confirmando que en células L6E9 esta forma mutada es insensible al malonil-CoA, como lo es en células  $\beta$  INS(832/13) y en levaduras que sobreexpresan esta proteína.

### 1.3. NIVELES DE PROTEÍNA LCPT I EN CÉLULAS L6E9 INFECTADAS CON Ad-LCPT I wt Y Ad-LCPT I M593S

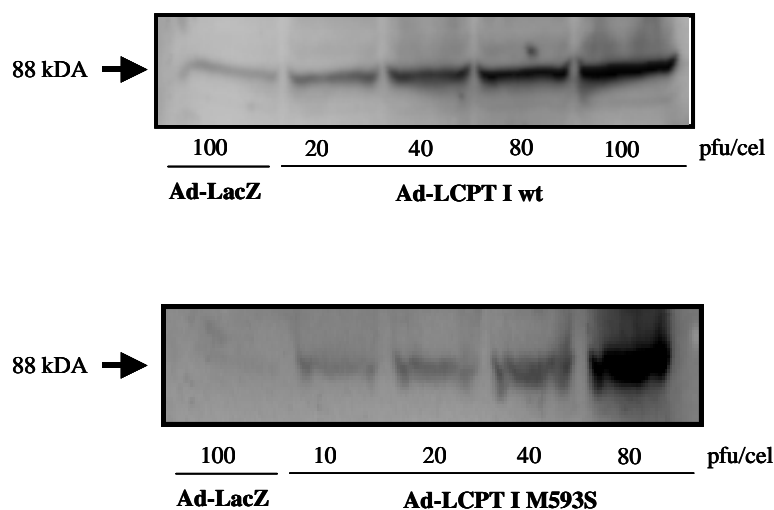
Puesto que ha sido descrito que la isoforma de CPT I que se expresa de forma endógena en diferentes líneas celulares de músculo esquelético es la LCPT I en lugar de la MCPT I, se realizó un Western blot utilizando anticuerpos anti ambas proteínas para determinar cuál era la isoforma expresada en las células L6E9.



**Fig. 5. Western blot de LCPT I y MCPT I.** Células L6E9 y mitocondrias de hígado o de músculo de rata como control positivo se sometieron a un western blot utilizando anticuerpos anti-L o MCPT I.

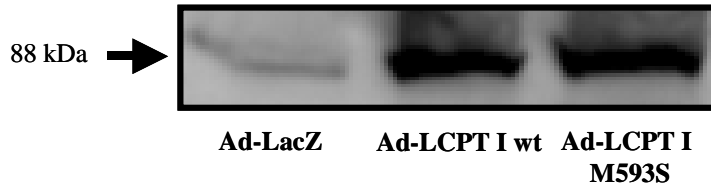
Como se observa en la fig. 5, en las células L6E9 se expresa la LCPT I, en lugar de la isoforma muscular MCPT I.

Posteriormente, para confirmar que los incrementos en la actividad CPT I vistos en las células infectadas con los virus se correlacionaban con incrementos en los niveles de expresión de proteína LCPT I se realizaron experimentos de Western blot. Las células se infectaron con cantidades crecientes de Ad-LCPT I wt o Ad-LCPT I M593S y los niveles de proteína se analizaron usando un anticuerpo específico anti LCPT I, dando una banda de 88 kDa correspondiente a la LCPT I. Como se muestra en la fig. 6, la intensidad de las bandas aumentó con la cantidad de virus usada.



**Fig. 6. Western blot de células L6E9 infectadas con Ad-LCPT I wt y Ad-LCPT I M593S.** Las células se infectaron con cantidades crecientes de Ad-LCPT I wt y Ad-LCPT I M593S y con 100 pfu/cel de Ad-LacZ como control. El lisado celular se analizó por Western blot usando un anticuerpo específico contra la LCPT I de rata, dando una banda de 88 kDa.

De la misma forma que se hizo con la actividad CPT I, las células se infectaron también con la cantidad de cada virus que elevó 6 veces la actividad CPT I para evaluar los niveles de proteína. Así, las células se infectaron con 40 pfu/cel para el Ad-LCPT I wt y 20 pfu/cel para el Ad-LCPT I M593S y se realizó el Western blot (fig. 7).



**Fig. 7. Western blot de células L6E9 infectadas con Ad-LCPT I wt y Ad-LCPT I M593S.** Las células se infectaron con 40 pfu/cel para el Ad-LCPT I wt y 20 pfu/cel para el Ad-LCPT I M593S y fueron sometidas a un western blot utilizando un anticuerpo específico contra la L-CPT I de rata.

Como se observa en la fig. 7, los niveles de proteína son semejantes para ambas formas de LCPT I, indicando que estas dos cantidades de virus provocaron el mismo incremento en los niveles de proteína. Esto es consistente con el mismo incremento en la actividad CPT I mostrado en la fig. 3.

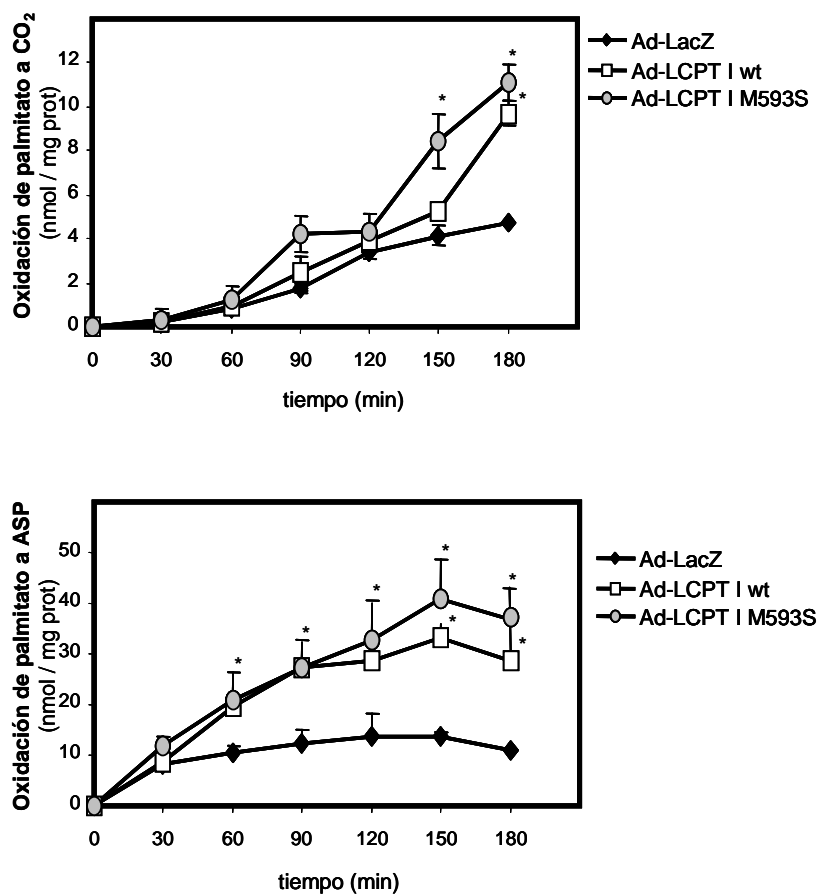
#### 1.4. EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE L-CPT I EN LA OXIDACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

Para evaluar la relevancia metabólica de la sobreexpresión de ambas formas de LCPT I (wt y M593S) se realizaron ensayos de oxidación de ácidos grasos. Para determinar la oxidación de ácidos grasos dependiente de la CPT I se utilizó un ácido graso de cadena larga, el palmitato, y para evaluar la oxidación independiente de la CPT I se utilizó el ácido graso de cadena media octanoato, que puede entrar en la mitocondria independientemente de la CPT I. La oxidación de ácidos grasos se midió tanto como la producción de CO<sub>2</sub>, que indica la oxidación completa de la molécula de ácido graso, como por la producción de productos ácidos solubles (ASPs), que en células musculares son principalmente intermediarios del ciclo de Krebs, acetil-CoA y palmitoilcarnitina<sup>3</sup>. Las células L6E9 se infectaron con los virus Ad-LacZ, Ad-LCPT I

<sup>3</sup> Veerkamp JH, van Moerkerk TB, Glatz JFC, Zuurveld JGEM, Jacobs AEM, Wagenmakers AJ. <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> production is no adequate measure of fatty acid oxidation. *Biochem Med Metab Biol* 1986, 35:248-259

wt o Ad-LCPT I M593S tal y como se ha descrito en Materiales y Métodos y el día del experimento se incubaron las células 30 min con KRBH 1% BSA y se midió la oxidación incubando las células con  $[1-^{14}\text{C}]$ palmitato o  $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato según el caso.

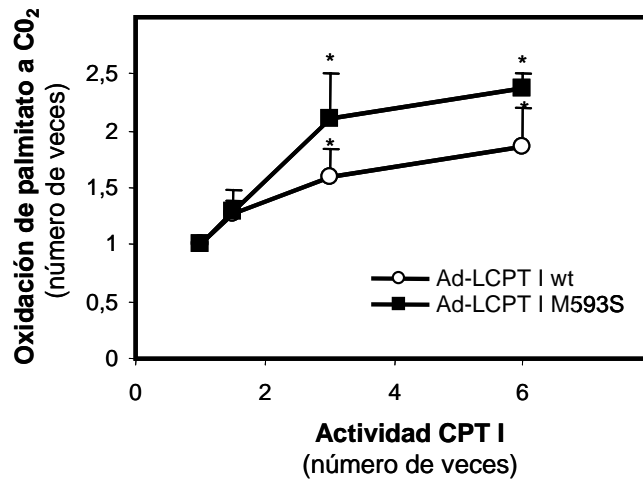
En primer lugar se evaluó la oxidación de palmitato respecto el tiempo para fijar las condiciones idóneas del ensayo. Para este experimento las células se infectaron con la cantidad de virus necesaria para elevar 3 veces la actividad CPT I (20 pfu/cel para el Ad-LCPT I wt y 10 pfu/cel para el Ad-LCPT I M593S) por el motivo que se explicará más adelante y se midió la oxidación a 30, 60, 90, 120, 150 y 180 min (fig. 8).



**Fig. 8. Oxidación de palmitato en células L6E9 infectadas con Ad-LCPT I wt y Ad-LCPT I M593S.** Las células se infectaron durante 30 h con la cantidad de los virus necesaria para aumentar la actividad CPT I 3 veces. 48 h después de la infección las células se incubaron 30 min a 37°C con KRBH 1% BSA y se incubaron durante el tiempo indicado con 2,5 mM glucosa en presencia de 0,8 mM carnitina más 0,25 mM palmitato y 1  $\mu\text{Ci/ml}$   $[1-^{14}\text{C}]$ palmitato unido a 1% BSA. La oxidación de palmitato se determinó a CO<sub>2</sub> (A) y productos solubles ácidos o ASPs (B) en botellas de 25 cm<sup>2</sup>. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes realizados por duplicado. \* $P < 0,05$  respecto Ad-LacZ.

Como se observa en la fig. 8 la oxidación de palmitato a  $\text{CO}_2$  comienza a ser visible a partir de los 60 min. Antes de este tiempo apenas se ve producción de  $\text{CO}_2$ , indicando que es necesario un tiempo para que la molécula de palmitato se oxide completamente. A partir de este tiempo el incremento en la producción de  $\text{CO}_2$  se mantuvo lineal en las células infectadas con Ad-LacZ pero no ocurrió lo mismo con las células que sobreexpresan la LCPT I. En éstas últimas la oxidación fue lineal respecto al tiempo hasta los 120 min, momento el cual se empezaron a ver diferencias significativas en la oxidación de palmitato a  $\text{CO}_2$  entre las células infectadas con Ad-LacZ y las células infectadas con Ad-LCPT I wt o Ad-LCPT I M593S. En el caso de la oxidación a ASPs, estos metabolitos empiezan a verse ya a los 30 min, consistente con que son especies aún no totalmente oxidadas y por lo tanto aparecen antes que el  $\text{CO}_2$ . Para las células infectadas con Ad-LacZ la producción de ASPs alcanza una saturación a los 30 min, mientras que para las células infectadas con Ad-LCPT I wt o Ad-LCPT I M593S esta saturación no se alcanza hasta los 120 min.

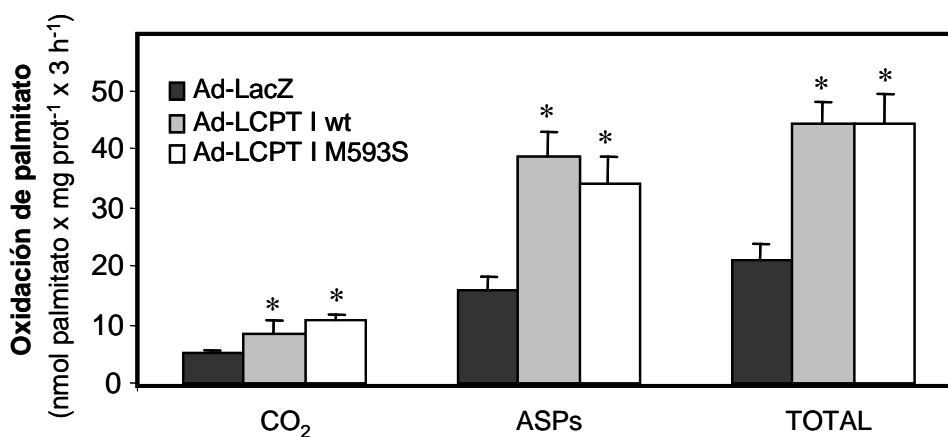
Una vez fijado el tiempo de oxidación a 3 h, el siguiente paso fue evaluar los incrementos en la oxidación en relación con los incrementos en la actividad CPT I. Para ello se infectaron las células con diferentes cantidades de Ad-LCPT I wt o Ad-LCPT I M593S y se midió la oxidación de palmitato (fig. 9).



**Fig. 9. Oxidación de palmitato en células L6E9 infectadas con diferentes cantidades de Ad-LCPT I wt y Ad-LCPT I M593S.** Las células fueron infectadas con las cantidades de virus que aumentaron 1,5, 3 y 6 veces la actividad CPT I y se midió la oxidación de palmitato a  $\text{CO}_2$  durante 3 h en placas de 6 pocillos. Los resultados son la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes. \* $P < 0,05$  respecto incremento de 1 vez en la actividad CPT I

La oxidación de palmitato a  $\text{CO}_2$  aumentó hasta un máximo de 1,9 y 2,4 veces para las células infectadas con Ad-LCPT I wt o Ad-LCPT I M593S respectivamente, cuando la actividad CPT I era 6 veces superior al control. Por lo tanto no se observó una correlación directa entre el aumento de la actividad y de la oxidación, puesto que incrementos de 6 veces en la actividad sólo condujeron a aumentos de aproximadamente 2 veces en la oxidación. Además, a partir de un incremento de 3 veces en la actividad CPT I, los incrementos en la oxidación se alejaron de la linealidad y se observó un efecto de saturación. Así, para 3 veces más de actividad CPT I se obtuvo un incremento en la oxidación de 1,6 y 2,1 veces con Ad-LCPT I wt o Ad-LCPT I M593S respectivamente. Dadas estas pequeñas diferencias en la oxidación aún cuando la actividad aumentó de 3 a 6 veces, se decidió usar la cantidad de virus que aumenta la 3 veces actividad CPT I como condiciones de infección para los posteriores experimentos (20 pfu/cel para el Ad-LCPT I wt y 10 pfu/cel para el Ad-LCPT I M593S).

Una vez fijados el tiempo de oxidación y la cantidad de virus a utilizar, se realizó un último experimento de oxidación en el cual se evaluó tanto la oxidación a  $\text{CO}_2$ , como la oxidación a ASPs y la oxidación total de las células L6E9 tras la infección con la cantidad de virus que aumentó 3 veces la actividad CPT I. Los resultados se muestran en la fig. 10.

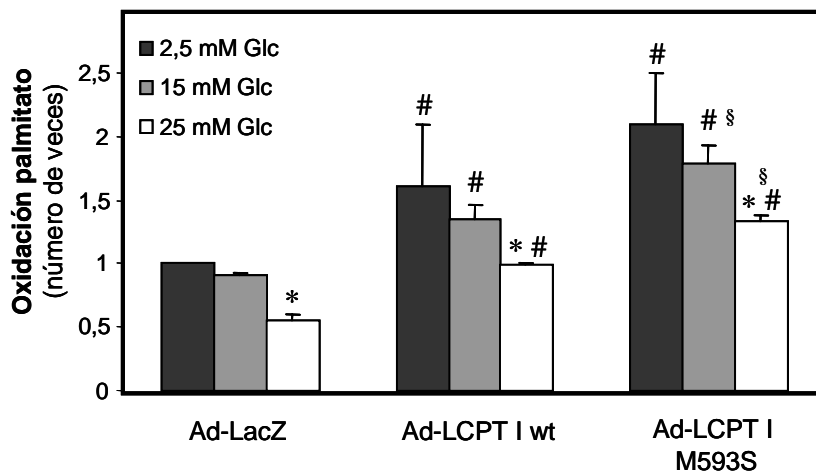


**Fig. 10. Oxidación de palmitato en células L6E9 infectadas con Ad-LCPT I wt y Ad-LCPT I M593S.** Las células fueron infectadas con la cantidad de virus que incrementó 3 veces la actividad CPT I tal y como se ha descrito en Materiales y Métodos y se midió la oxidación de palmitato a  $\text{CO}_2$ , ASPs y la suma de ambos (oxidación total) durante 3 h. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes realizados en duplicado. \* $P < 0,05$  respecto Ad-LacZ.



El aumento de 3 veces de la actividad CPT I produjo un aumento del 60% en la oxidación de palmitato a CO<sub>2</sub> en el caso de Ad-LCPT I wt y del 110% en el caso de Ad-LCPT I M593S. Así, aunque sin diferencias significativas, la sobreexpresión de la L-CPT I insensible a malonil-CoA produjo un ligero aumento en la oxidación de palmitato a CO<sub>2</sub> respecto a la sobreexpresión de la L-CPT I wt. Esto no ocurrió con la oxidación a ASPs y la oxidación total, donde los incrementos fueron en ambos casos del 100% con ambos virus. Así se concluye que la sobreexpresión de la LCPT I wt o M593S produjo un aumento de 2 veces en la oxidación de palmitato para un incremento de 3 veces en la actividad CPT I.

La oxidación de palmitato ha sido evaluada hasta el momento a una concentración de glucosa de 2,5 mM. Debido a que la glucosa y los ácidos grasos compiten como sustrato en células musculares<sup>4</sup> (ciclo de glucosa-ácidos grasos o de Randle) y que el medio utilizado para el crecimiento de las células L6E9 tiene una concentración de glucosa de 25 mM, se realizó un experimento de oxidación de palmitato a cantidades crecientes de glucosa (fig.11).

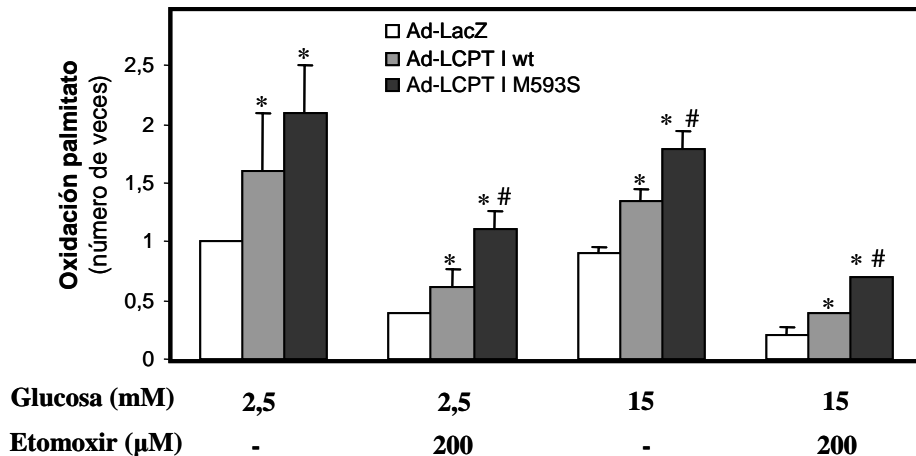


**Fig. 11. Oxidación de palmitato a CO<sub>2</sub> en células L6E9 infectadas con Ad-LCPT I wt y Ad-LCPT I M593S a diferentes concentraciones de glucosa.** Las células fueron infectadas con la cantidad de virus que incrementó 3 veces la actividad CPT I tal y como se ha descrito en Materiales y Métodos y se midió la oxidación de palmitato a CO<sub>2</sub> durante 3 h a 2,5, 15 y 25 mM glucosa. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes realizados en duplicado. \* $P < 0,05$  respecto 2,5 mM glucosa, # $P < 0,05$  respecto Ad-LacZ, § $P < 0,05$  respecto Ad-LCPT I wt.

<sup>4</sup> Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose fatty-acid cycle: its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1963, 1:785-789

Como se observa en la fig. 11 la oxidación de palmitato disminuyó entre un 10-15 % al aumentar la concentración de glucosa a 15 mM. Cuando la concentración de glucosa aumentó a 25 mM, la oxidación de palmitato disminuyó un 45% para las células infectadas con Ad-LacZ y un 35% para las células infectadas con Ad-LCPT I wt o Ad-LCPT I M593S. A 15 mM glucosa la oxidación de palmitato fue un 50% mayor en aquellas células que sobreexpresaban LCPT I wt y un 80% mayor en aquellas que sobreexpresaban LCPT I M493S respecto a las células control. A 25 mM de glucosa estas diferencias crecieron a un 80% para el caso de las células infectadas con Ad-LCPT I wt y a un 110% en aquellas células infectadas con Ad-LCPT I M593S. Así se observó una diferencia de un 30% en la oxidación de palmitato entre las células que sobreexpresan LCPT I wt y las que sobreexpresan LCPT I M493S a altas concentraciones de glucosa.

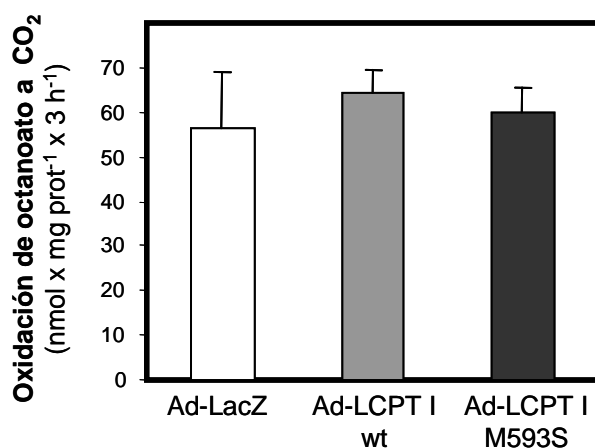
Con el fin de comprobar si este aumento en la oxidación de palmitato era debido a un aumento de la actividad CPT I, las células se incubaron en presencia o ausencia de 200  $\mu$ M de etomoxir y se determinó la oxidación de palmitato a CO<sub>2</sub> a baja (2,5 mM) y alta (15 mM) concentración de glucosa (fig. 12).



**Fig. 12. Oxidación de palmitato a CO<sub>2</sub> en células L6E9 infectadas con Ad-LCPT I wt y Ad-LCPT I M593S en presencia de etomoxir.** Las células fueron infectadas con la cantidad de virus que incrementó 3 veces la actividad CPT I tal y como se ha descrito en Materiales y Métodos y se midió la oxidación de palmitato a CO<sub>2</sub> durante 3 h a 2,5, y 15 mM glucosa y en presencia o ausencia de 200  $\mu$ M de etomoxir. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes realizados en duplicado. \* $P$ <0,05 respecto Ad-LacZ, # $P$ <0,05 respecto Ad-LCPT I wt.

La presencia del inhibidor irreversible de la CPT I etomoxir inhibió la oxidación en un 60% aproximadamente a baja concentración de glucosa y en un 75% a alta concentración de glucosa. Sin embargo la sobreexpresión de la LCPT I M593S produjo una mayor oxidación de palmitato en presencia de etomoxir que la sobreexpresión de la LCPT I wt y que en las células control. Así, en presencia de etomoxir la oxidación de palmitato aumentó un 180% y un 250% a baja y alta glucosa respectivamente en aquellas células infectadas con Ad-LCPT I M593S respecto a las células control. Para el caso de las células infectadas con Ad-LCPT I wt este incremento fue del 50% y 100% a baja y alta glucosa respectivamente.

Por último, para comprobar que el incremento en la oxidación de palmitato observado en las células que sobreexpresan la L-CPT I era debido exclusivamente a un incremento en el transporte de los ácidos grasos de cadena larga dentro de la mitocondria y no a un efecto sobre la oxidación en sí misma, se realizó un ensayo de oxidación de octanoato. Este ácido graso de cadena media entra en la mitocondria para ser oxidado independientemente de la CPT I, sirviendo así para evaluar la oxidación de ácidos grasos no controlada por la CPT I. Las condiciones de este ensayo son las mismas que para la oxidación de palmitato (fig. 13).

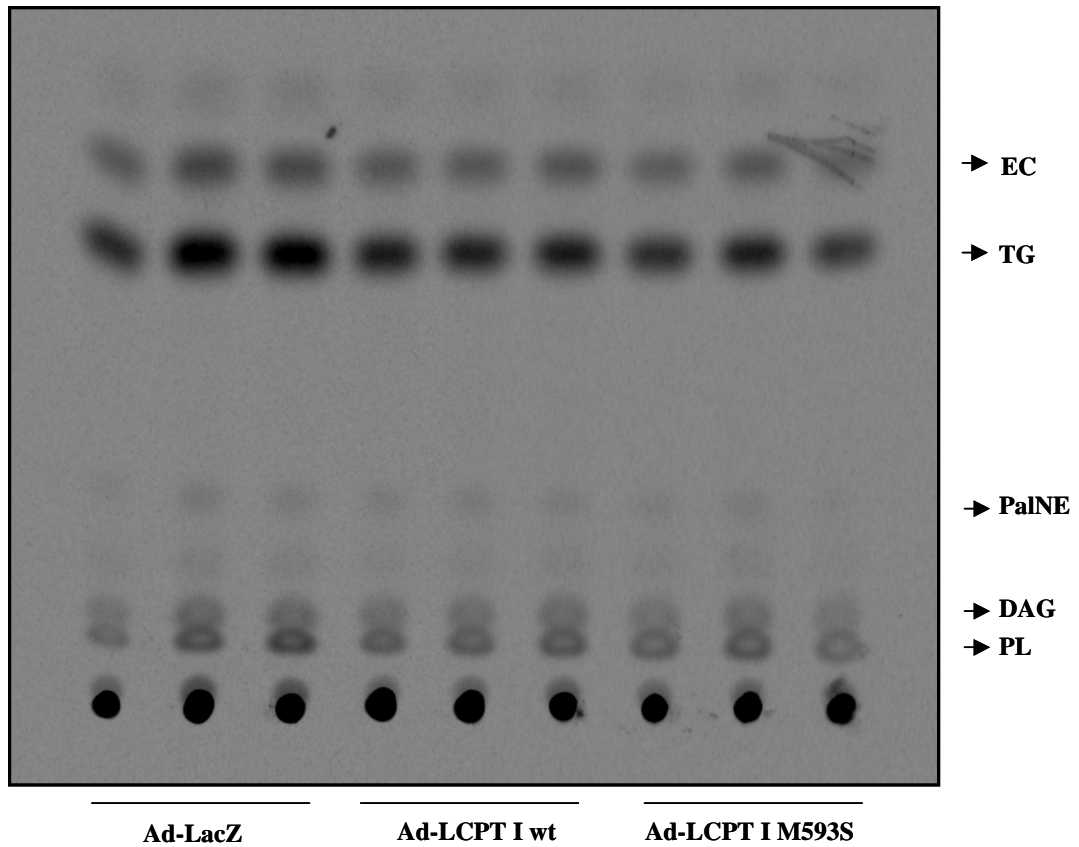


**Fig. 13. Oxidación de octanoato en células L6E9 infectadas con Ad-LCPT I wt y Ad-LCPT I M593S.** Las células fueron infectadas con la cantidad de virus que incrementó 3 veces la actividad CPT I tal y como se ha descrito en Materiales y Métodos y se midió la oxidación de octanoato a CO<sub>2</sub> en placas de 6 pocillos durante 3 h. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD de dos experimentos independientes realizados en duplicado.

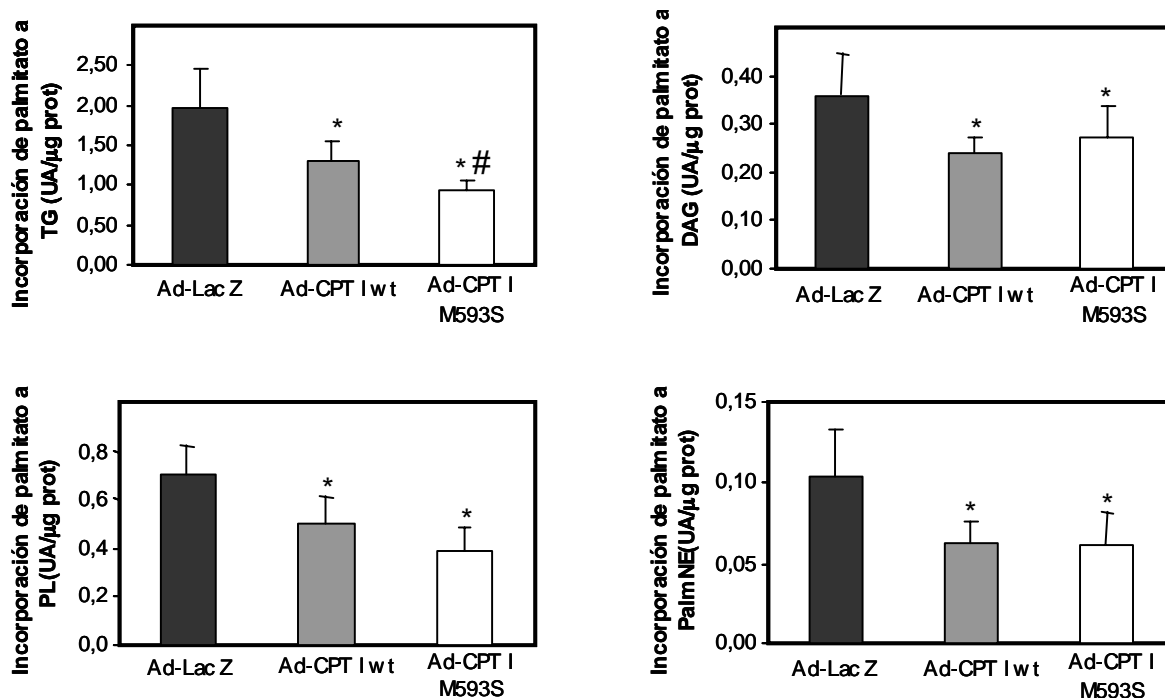
Como se observa en la figura la oxidación de octanoato no sufrió ningún cambio tras la infección con los adenovirus, indicando que la sobreexpresión de la CPT I sólo afecta a la oxidación de ácidos grasos de cadena larga, ya que dependen de su actividad para ser transportados a la mitocondria y ser oxidados. Además, este experimento sirve para confirmar que la infección con los adenovirus no alteró el metabolismo celular debido al posible efecto tóxico que pudieran tener.

### **1.5. EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE L-CPT I EN LA INCORPORACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS A LÍPIDOS CELULARES**

El hecho de que la sobreexpresión de las dos formas de L-CPT I cause un incremento de 2 veces en la oxidación total de palmitato puede sugerir que el uso del palmitato para la síntesis de lípidos celulares puede verse disminuida. Para confirmar esta hipótesis se realizó un experimento de incorporación de palmitato marcado radiactivamente a lípidos celulares. Para ello se incubaron las células 16 h en un medio con 0,25 mM de palmitato radiactivo y en presencia de 25 mM glucosa. Tras esta incubación, se extrajeron los lípidos celulares, se separaron por cromatografía en capa fina y se cuantificó la cantidad de marcaje radiactivo proveniente del palmitato que había en cada especie lipídica. En la figura 14 se muestra una cromatografía en capa fina representativa de uno de los experimentos y la figura 15 se muestra la cuantificación de todos los experimentos realizados.



**Fig. 14. Experimento representativo de incorporación de palmitato a lípidos celulares en células L6E9 infectadas con Ad-LCPT I wt y Ad-LCPT I M593S.** Las células se infectaron con la cantidad de virus que incrementó 3 veces la actividad CPT I y se incubaron 16 h con DMEM 0,25 mM [1-<sup>14</sup>C]-palmitato. Se extrajeron los lípidos intracelulares y se separaron mediante una cromatografía en capa fina. EC: esteres de colesterol, TG: triglicéridos, PalNE: palmitato no esterificado, DAG: diacilglicerol, PL:fosfolípidos.



**Fig. 15. Incorporación de palmitato a lípidos celulares en células L6E9 infectadas con Ad-LCPT I wt y Ad-LCPT I M593S.** Las células se infectaron con la cantidad de virus que incrementó 3 veces la actividad CPT I y se incubaron 16 h con DMEM 0,25 mM [1-<sup>14</sup>C]-palmitato. Se extrajeron los lípidos intracelulares y se separaron mediante una cromatografía en capa fina. La intensidad de cada banda se cuantificó utilizando el sistema de escáner Storm 840. Los resultados se expresan como unidades arbitrarias corregidas por la cantidad de proteína y son la media  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. \* $P < 0,05$  respecto Ad-LacZ, # $P < 0,05$  respecto Ad-LCPT I wt.

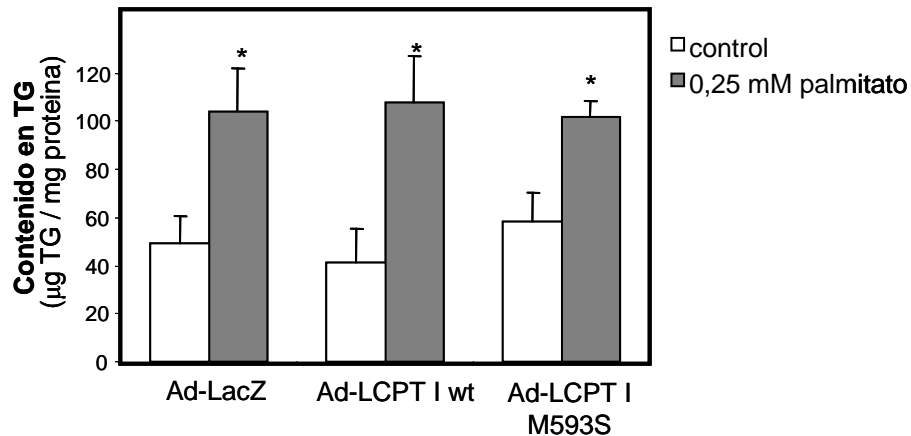
Los diferentes lípidos analizados fueron los triglicéridos (TG), fosfolípidos (PL), diacilglicerol (DAG) y palmitato no esterificado (PalNE). En todos los casos la sobreexpresión de ambas formas de L-CPT I (wt o M593S) produjeron una disminución de la incorporación de palmitato a lípidos celulares. Estas disminuciones fueron del 33%, 34%, 29% y 40% para TG, DAG, PL y PalNE respectivamente en células infectadas con Ad-LCPT I wt, y del 53%, 23%, 45% y 41% para TG, DAG, PL y PalNE respectivamente en células infectadas con Ad-LCPT I M593S. La única diferencia significativa entre las células infectadas con Ad-LCPT I wt o Ad-LCPT I M593S se observó en la incorporación a TG, siendo ésta menor para las células que sobreexpresan la forma mutada de la L-CPT I.

## 1.6. EFECTO DE LA SOBREENEXPRESIÓN DE L-CPT I EN LOS NIVELES CELULARES DE METABOLITOS DERIVADOS DE ÁCIDOS GRASOS

Se ha descrito que los niveles de TG y otros derivados de los ácidos grasos como las ceramidas y el DAG juegan un papel importante en la aparición de la resistencia a la insulina en músculo<sup>5</sup>. Debido al incremento de la oxidación de ácidos grasos provocado por la sobreexpresión de la L-CPT I, es de interés medir los niveles de estos metabolitos y ver si este incremento de oxidación de ácidos grasos es capaz de disminuir su acumulación dentro de la célula muscular.

### 1.6.1. Niveles celulares de triglicéridos

Las células se infectaron con los adenovirus y se incubaron 16 h en DMEM 0,25 mM palmitato y 25 mM glucosa. Tras la incubación se extrajeron los lípidos intracelulares y se cuantificaron los TG tal y como se ha descrito en Materiales y Métodos (fig. 16).



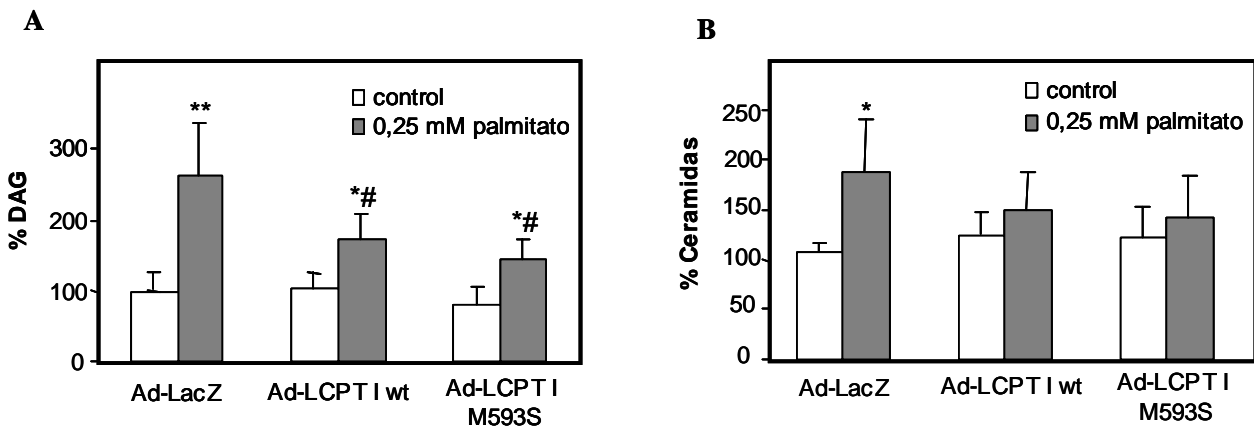
**Fig. 16. Niveles intracelulares de triglicéridos en células L6E9 infectadas con Ad-LCPT I wt y Ad-LCPT I M593S.** Las células se infectaron con los diferentes adenovirus y se incubaron 16 h en presencia de DMEM 0,25 mM palmitato o 0,05 mM BSA (control). Se extrajeron los lípidos intracelulares y se determinó el contenido en TG utilizando un kit comercial (Sigma-Aldrich). Los resultados se son la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes realizados por duplicado. \* $P < 0,05$  respecto control.

<sup>5</sup> Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, Bell K, Barucci N, Lee D, Goodyear LJ, Kraegen EW, White MF, Shulman GI. Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase  $\theta$  and alterations in the insulin signalling cascade. *Diabetes* 1999, 48:1270-1274

La incubación con 0,25 mM palmitato durante 16 h produjo un incremento de 2 veces en los niveles celulares de TG. Este incremento se produjo tanto en las células control (infectadas con Ad-LacZ) como en las células infectadas con Ad-LCPT I wt o Ad-LCPT I M593S que sobreexpresan la CPT I. Esto sugiere que la sobreexpresión de la L-CPT I no es capaz de alterar el contenido celular total en TG, aún produciendo un incremento en la oxidación de ácidos grasos.

### 1.6.2. Niveles celulares de DAG y ceramidas

Las células se infectaron con los diferentes virus y se incubaron 16 h en DMEM 0,25 mM palmitato y 25 mM glucosa. Tras la incubación se extrajeron los lípidos intracelulares y se cuantificaron el DAG y las ceramidas tal y como se ha descrito en Materiales y Métodos (fig. 17).



**Fig. 17. Niveles intracelulares de DAG y ceramidas en células L6E9 infectadas con Ad-LCPT I wt y Ad-LCPT I M593S.** Las células se infectaron con los diferentes adenovirus y se incubaron 16 h en presencia de DMEM 0,25 mM palmitato o 0,05 mM BSA (control). Se extrajeron los lípidos intracelulares y se determinó el contenido en DAG (A) o ceramidas (B) utilizando un kit comercial (Amershan Biosciences). Los resultados se son la media  $\pm$  SD de cuatro experimentos independientes realizados por duplicado. \* $P < 0,05$  respecto control, \*\* $P < 0,001$  respecto control y # $P < 0,05$  respecto Ad-LacZ + 0,25 mM palmitato.

La incubación con 0,25 mM de palmitato durante 16 h produjo un aumento del 160% en los niveles de DAG y del 90% en los niveles de ceramidas en las células control (infectadas con Ad-LacZ). En las células infectadas con Ad-LCPT I wt o Ad-LCPT I M593S estos incrementos se redujeron al 70% y 50% respectivamente para el caso del DAG y no aumentaron significativamente en el caso de las ceramidas. Aunque



las sobreexpresión de la L-CPT I mutada provocó un menor aumento en los niveles de DAG frente a la sobreexpresión de la L-CPT I wt (50% frente a 70%), estas diferencias no fueron significativas.

## **1.7. EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE L-CPT I EN EL METABOLISMO DE GLUCOSA ESTIMULADO POR INSULINA**

Se ha descrito que la incubación durante 16 h con una concentración de ácidos grasos elevada (por ejemplo 0,25 mM) provoca la aparición de resistencia a la insulina en células musculares en cultivo<sup>6,7</sup>. Para comprobar esto en las células L6E9 y para estudiar si la sobreexpresión de ambas formas de L-CPT I puede proteger contra este efecto, se realizaron estudios del metabolismo de la glucosa estimulado por insulina.

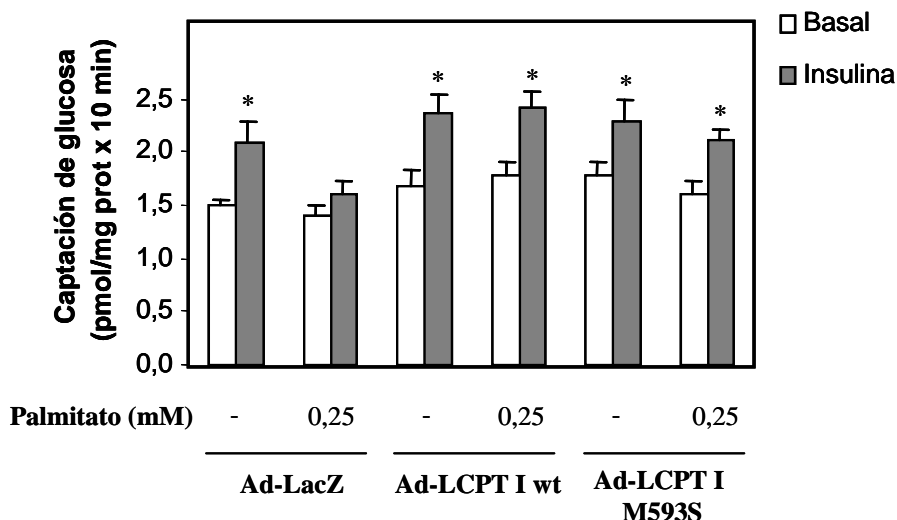
### **1.7.1. Captación de glucosa estimulada por insulina**

La insulina activa el transporte de glucosa en células musculares a través de una cascada de señales bien estudiada. Para determinar la sensibilidad a la insulina de las células L6E9 así como el efecto de la incubación con palmitato y la sobreexpresión de la L-CPT I, las células se infectaron con Ad-LCPT I wt o Ad-LCPT I M593S, se incubaron con o sin palmitato 0,25 mM durante 16 h y se realizó el ensayo de captación de glucosa en presencia o ausencia de insulina (fig. 18).

---

<sup>6</sup> Schmitz-Peiffer C, Craig DL, Biden TJ. Ceramide generation is sufficient to account for the inhibition of the insulin-stimulated PKB pathway in C2C12 skeletal muscle cells pretreated with palmitate. *J Biol Chem.* 1999, 274(34):24202-10.

<sup>7</sup> Perdomo G, Commerford RS, Richard AM, Adams SH, Corkey BE, O'Doherty RM, Brown NF. Increased B-oxidation in muscle cells enhances insulin stimulated glucose metabolism and protects against fatty acid induced insulin resistance despite intramyocellular lipid accumulation. *J Biol Chem* 2004, 279:27177-27186

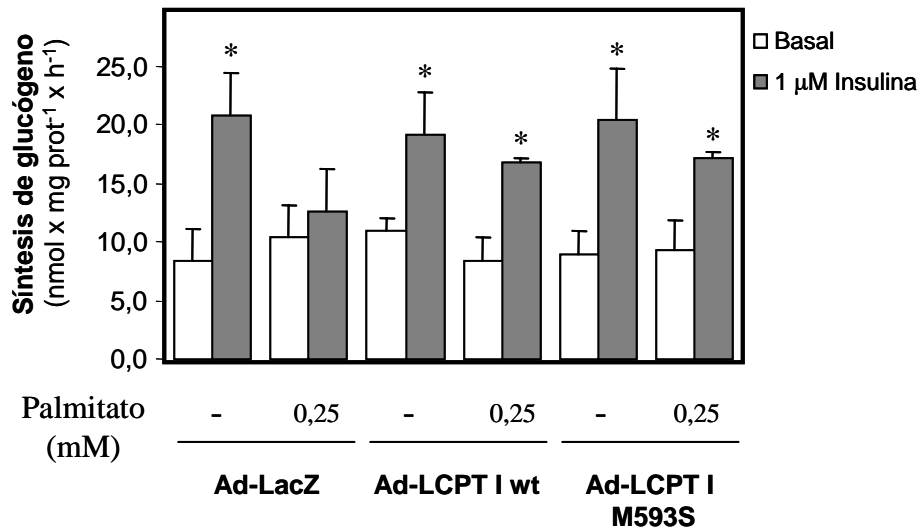


**Fig. 18. Captación de 2-deoxiglucosa en células L6E9 infectadas con Ad-LCPT I wt y Ad-LCPT I M593S.** Las células se infectaron con los diferentes adenovirus y se incubaron 16 h en presencia de DMEM 0,25 mM palmitato o 0,05 mM BSA (control). El día del ensayo las células se incubaron 30 min con o sin insulina 1  $\mu$ M y la captación de glucosa se midió usando 2-deoxiglucosa-<sup>3</sup>H durante 10 min. Los resultados son la media  $\pm$  SD de cinco experimentos independientes realizados por duplicado. \* $P$ <0,05 respecto basal.

La insulina produjo un incremento en la captación de glucosa de aproximadamente el 50% tanto en las células control como en las células infectadas con Ad-LCPT I wt o Ad-LCPT I M593S. La incubación con 0,25 mM palmitato durante 16 h produjo una inhibición de esta captación de glucosa estimulada por insulina en las células control (infectadas con Ad-LacZ), induciendo pues una resistencia a la insulina en estas células. En aquellas células infectadas con Ad-LCPT I wt o Ad-LCPT I M593S esta inhibición no se dio y la captación de glucosa estimulada por insulina fue igual que en las células no tratadas con palmitato.

### 1.7.2. Síntesis de glucógeno estimulada por insulina

Además de activar el transporte de glucosa, la insulina también activa la síntesis de glucógeno en células musculares. Por lo tanto, otra forma de evaluar la sensibilidad a la insulina en estas células es medir los niveles de glucógeno en presencia o ausencia de insulina. Las células infectadas con los diferentes virus se incubaron 16 h en presencia o ausencia de 0,25 mM palmitato y se evaluó la incorporación de glucosa marcada radiactivamente a glucógeno durante 1 h en presencia o ausencia de insulina (fig.19).



**Fig. 19. Incorporación de glucosa en glucógeno en células L6E9 infectadas con Ad-LCPT I wt y Ad-LCPT I M593S.** Las células se infectaron con los diferentes adenovirus y se incubaron 16 h en presencia de DMEM 0,25 mM palmitato o 0,05 mM BSA (control). El día del ensayo las células se incubaron 1 h con 4  $\mu\text{Ci/ml}$  D-[U-<sup>14</sup>C]-glucosa en presencia o ausencia de insulina 1 $\mu\text{M}$ , se extrajo el glucógeno intracelular y se evaluó la glucosa radiactiva incorporada. Los resultados son la media  $\pm$  SD de cuatro experimentos independientes realizados por duplicado. \* $P < 0,05$  respecto basal.

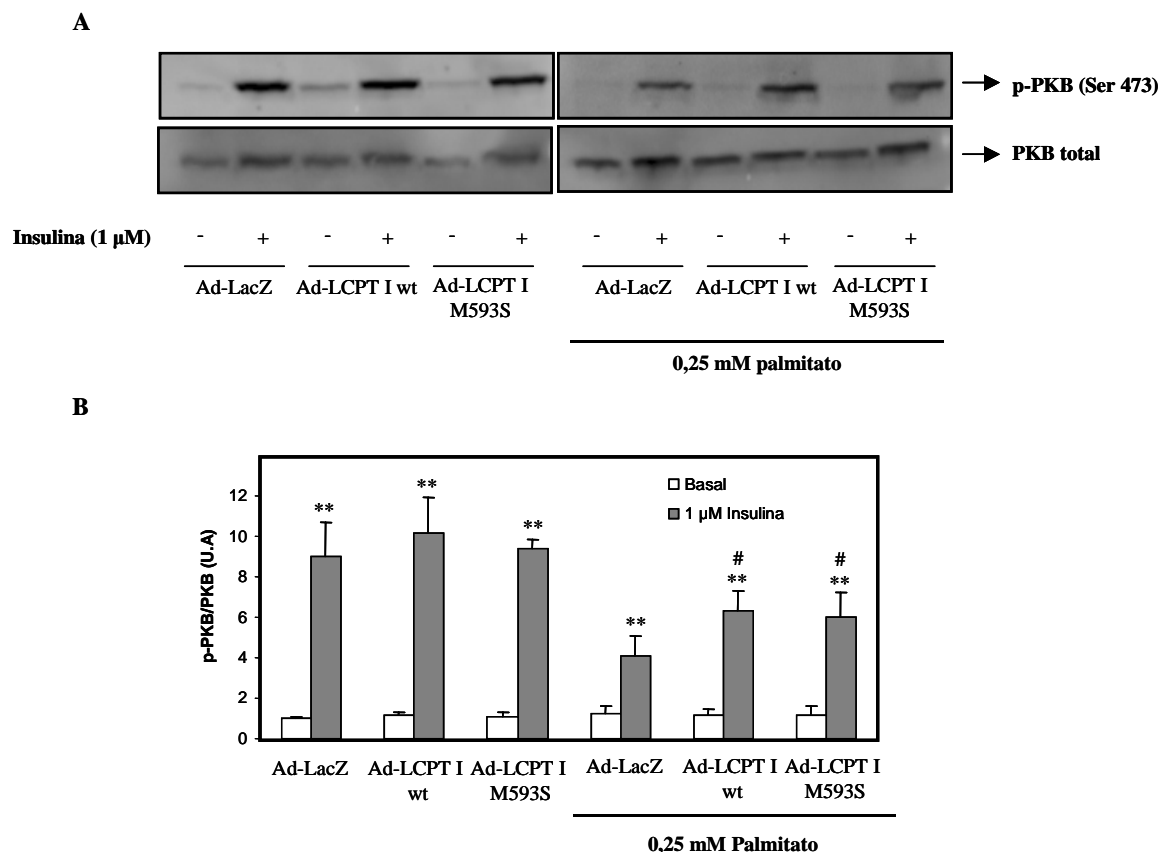
La presencia de insulina causó un incremento de 2 veces en la incorporación de glucosa a glucógeno tanto en las células control como en las células infectadas con Ad-LCPT I wt o Ad-LCPT I M593S. El tratamiento con palmitato 0,25 mM causó una inhibición de la incorporación de glucosa a glucógeno en las células control, induciendo una resistencia a la insulina en estas células. En las células infectadas con Ad-LCPT I wt o Ad-LCPT I M593S no se vió este efecto, observándose que estas células conservaban su sensibilidad a la insulina incluso después del tratamiento con palmitato.

### 1.8. EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE L-CPT I EN LA ACTIVIDAD Akt/PKB

La insulina ejerce su acción estimuladora del metabolismo de la glucosa en células musculares debido en parte a la activación de una proteína quinasa llamada Akt/PKB. La insulina provoca la fosforilación de esta proteína en dos aminoácidos

concretos: Ser 473 y Thr 308<sup>8</sup>. La fosforilación de la PKB en estos residuos conduce a su activación, y la proteína activa puede fosforilar y activar a otras proteínas que conducirán a la activación del transporte de glucosa y de la síntesis de glucógeno.

Para evaluar el efecto del palmitato y de la sobreexpresión de la L-CPT I en la actividad Akt/PKB en las células L6E9, se determinó la actividad de esta proteína midiendo los niveles de fosforilación en Ser 473 utilizando un anticuerpo específico contra la proteína fosforilada en este residuo (fig 20).



**Fig. 20. Actividad Akt/PKB en células L6E9 infectadas con Ad-LCPT I wt y Ad-LCPT I M593S.** Las células se infectaron con los diferentes adenovirus y se incubaron 16 h en presencia de DMEM 0,25 mM palmitato o 0,05 mM BSA (control). El día del ensayo las células se incubaron 10 min en presencia o ausencia de insulina 1μM. Se obtuvieron los extractos celulares y se sometieron a una electroforesis en condiciones desnaturalizantes y a un western blot utilizando anticuerpos específicos contra la proteína fosforilada en Ser 473 o la proteína total. A) Western blot ilustrativo. B) Cuantificación de la intensidad de cada banda de PKB fosforilada respecto a la PKB total presente en la muestra. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD de cinco experimentos independientes. \*\* $P < 0,001$  respecto basal, #  $P < 0,01$  respecto Ad-LacZ + palmitato.

<sup>8</sup> Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest* 2000, 106:165-169

La insulina produjo un aumento de 9 veces en la actividad Akt/PKB tanto en las células control como en las células infectadas con Ad-LCPT I wt o Ad-LCPT I M593S. La incubación con palmitato provocó una disminución del 60% de esta activación en respuesta a insulina en células control, pero sólo causó una disminución del 30% en las células infectadas con Ad-LCPT I wt y Ad-LCPT I M593S.

### **1.9. EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE L-CPT I EN LA ACTIVIDAD PKC $\theta$ y PKC $\zeta$**

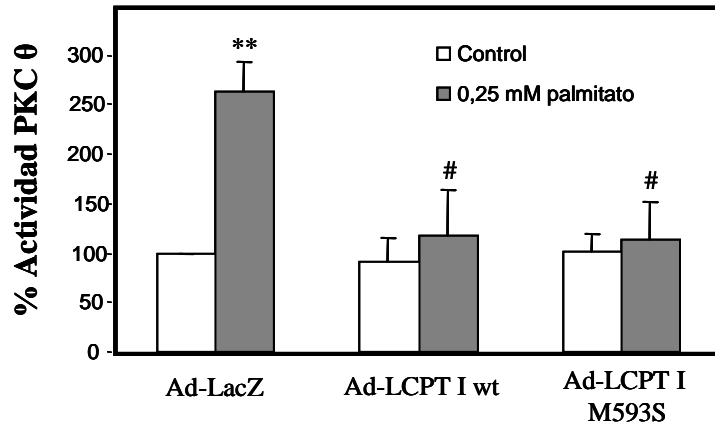
El DAG y las ceramidas ejercen sus efectos nocivos sobre la sensibilidad a la insulina activando dos proteínas quinasa involucradas directamente en la aparición de la resistencia a la insulina en células musculares<sup>5,9</sup>. El DAG es capaz de activar la PKC  $\theta$  y las ceramidas pueden activar la PKC  $\zeta$ . Para evaluar si la acumulación de DAG y ceramidas observada tras la incubación con palmitato conducía a un incremento en la actividad de estas dos proteínas, y ver el efecto de la sobreexpresión de la L-CPT I en este proceso, se determinaron las actividades de ambas proteínas. Para ello se inmunoprecipitaron usando anticuerpos específicos y se realizó un ensayo quinasa *in vitro* usando como sustratos MBP (proteína básica de mielina) y ATP radiactivo (fig. 21).

La incubación con 0,25 mM palmitato produjo un incremento del 150% en la actividad PKC  $\theta$  y de un 50% en la actividad PKC  $\zeta$  en las células control. En aquellas células infectadas con Ad-LCPT I wt o Ad-LCPT I M593S este incremento no se observó. Por lo tanto, la sobreexpresión de la CPT I bloqueó la activación de ambas proteínas en respuesta a palmitato.

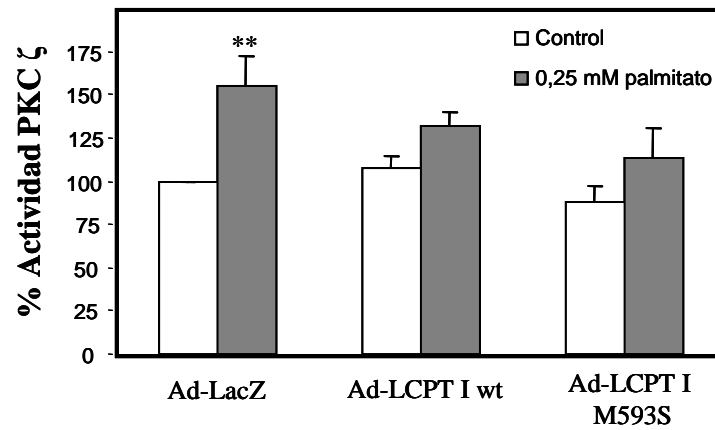
---

<sup>9</sup> Powell DJ, Turban S, Gray A, Hajduch E, Hundal HS. Intracellular ceramide synthesis and protein kinase C $\zeta$  activation play an essential role in palmitate-induced insulin resistance in rat L6 skeletal muscle cells. *Biochem J* 2004, 382:619-629

A



B



**Fig. 21. Actividad PKC  $\theta$  y PKC  $\zeta$  en células L6E9 infectadas con Ad-LCPT I wt y Ad-LCPT I M593S.** Las células se infectaron con los diferentes adenovirus y se incubaron 16 h en presencia de DMEM 0,25 mM palmitato o 0,05 mM BSA (control). Se obtuvieron los extractos celulares y se inmunoprecipitaron ambas proteínas utilizando anticuerpos específicos y se determinó la actividad PKC  $\theta$  (A) o la actividad PKC  $\zeta$  (B) usando como sustratos MBP y [ $^{32}$ P]- $\gamma$ -ATP. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes realizados por duplicado. \*\* $P$ <0,001 respecto control, # $P$ <0,05 respecto Ad-LacZ + palmitato.

## **2. EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE FAT/CD36 EN LA OXIDACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN CÉLULAS MUSCULARES L6E9**

La FAT/CD36 es una de las proteínas responsables del transporte de ácidos grasos a través de la membrana plasmática de la célula muscular. Recientemente se ha descrito que esta proteína podría jugar un papel importante en la regulación de la oxidación de ácidos grasos a nivel mitocondrial en músculo esquelético<sup>10</sup>. Se ha sugerido que la FAT/CD36 podría estar cooperando con la CPT I en el transporte de ácidos grasos a la matriz mitocondrial donde posteriormente serán oxidados.

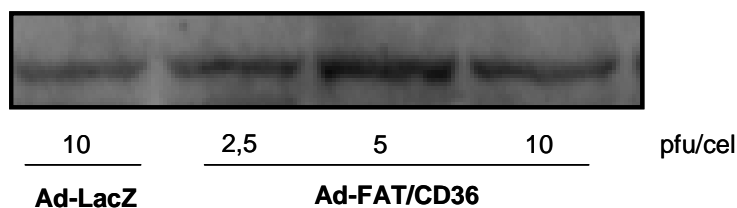
El hecho que en nuestro estudio el incremento de la oxidación de palmitato no aumentara más de dos veces por más que se elevase la actividad CPT I nos indujo a pensar que quizás algún otro factor estaría limitando la oxidación de ácidos grasos en las células de músculo L6E9. Con el objetivo de comprobar si este factor podría ser la FAT/CD36 se decidió sobreexpresar esta proteína juntamente con la CPT I y estudiar los efectos en la oxidación de palmitato.

### **2.1. NIVELES DE PROTEÍNA FAT/CD36 EN CÉLULAS L6E9 INFECTADAS CON Ad-FAT/CD36**

Para sobreexpresar la FAT/CD36 en las células L6E9 se utilizó el adenovirus Ad-FAT/CD36 que porta el cDNA que codifica para la proteína de rata. Se utilizaron las mismas condiciones de infección que para los adenovirus Ad-LCPT I wt y Ad-LCPT I M593S. En primer lugar se realizó un experimento de Western blot infectando las células con diferentes cantidades de virus para evaluar la capacidad infectiva de este adenovirus en las células L6E9 y escoger una cantidad adecuada para realizar las infecciones en posteriores experimentos. Los resultados se muestran en la figura 22.

---

<sup>10</sup> Campbell SE, Tandon NN, Woldergiorgis G, Luiken JJ, Glatz JF, Bonen A. A novel function for fatty acid translocase (FAT)/CD36. Involvement in long chain fatty acid transfer into the mitochondria. *J Biol Chem* 2004, 279:36235-36241



**Fig. 22. Western blot de células L6E9 infectadas con Ad-FAT/CD36.** Las células se infectaron con cantidades crecientes de Ad-FAT/CD36 y con 10 pfu/cel de Ad-LacZ como control. El lisado celular se analizó por Western blot usando un anticuerpo específico contra la FAT/CD36 de rata, dando una banda de 88 kDa.

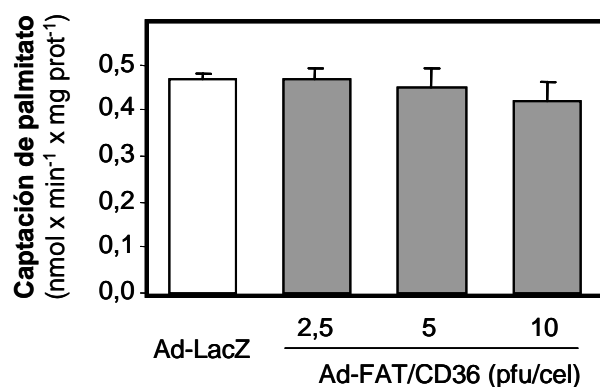
La infección con cantidades crecientes de adenovirus condujo a un aumento en la expresión de la proteína, siendo máximo con 5 pfu/cel, donde se observó un incremento de 2 veces en los niveles de FAT/CD36. A más cantidad de virus no se observaron mayores incrementos en los niveles de proteína, indicando un efecto de saturación.

## 2.2. CAPTACIÓN DE PALMITATO EN CÉLULAS L6E9 QUE SOBREENPRESAN FAT/CD36

La función principal de la FAT/CD36 es el transporte de ácidos grasos a través de la membrana plasmática. Para evaluar la funcionalidad de la proteína sobreexpresada se realizaron experimentos de captación de palmitato radiactivo en células L6E9 infectadas con diferentes cantidades de Ad-FAT/CD36 (fig.23).

La captación de palmitato no aumentó en las células que sobreexpresan la FAT/CD36, indicando que o bien la proteína sobreexpresada no era funcional o que los niveles de sobreexpresión logrados no eran suficientes para ver diferencias en el transporte de palmitato.



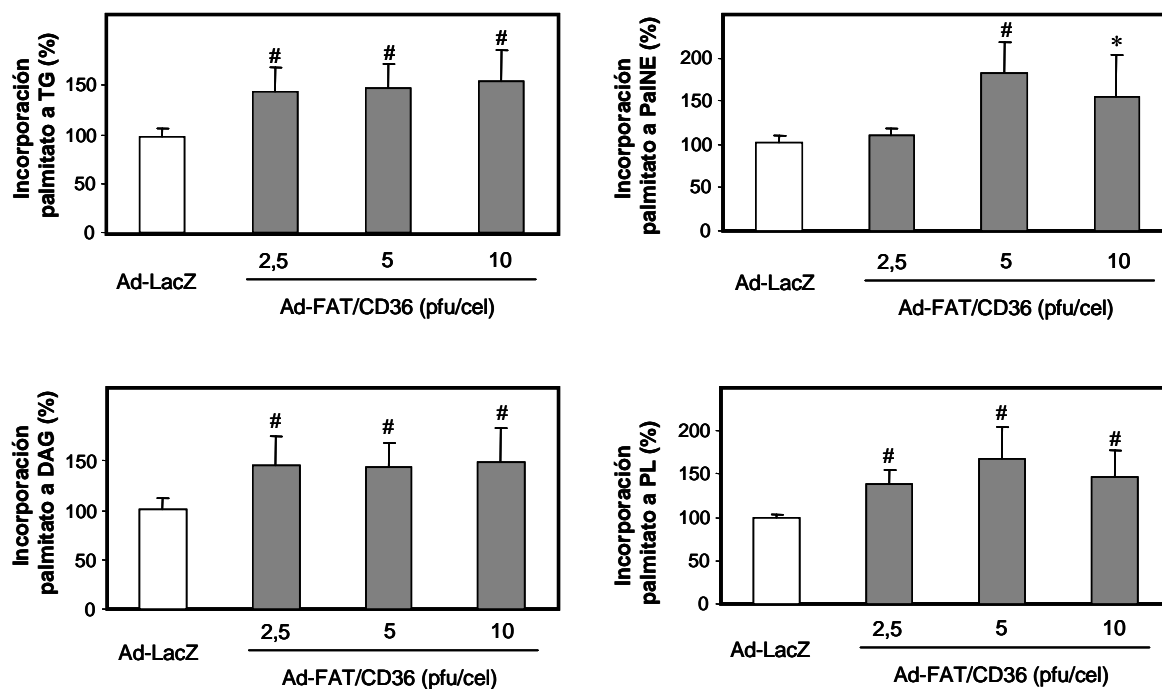


**Fig. 23. Captación de palmitato en células L6E9 infectadas con Ad-FAT/CD36.** Las células se infectaron con cantidades crecientes de virus y se determinó la captación de palmitato incubando las células con [1-<sup>14</sup>]palmitato unido a 1% BSA en presencia de 2,5 mM Glc durante 2 min. El transporte de palmitato se paró mediante aspiración y lavado con KRBH 0,5% BSA. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD de dos experimentos independientes realizados en duplicado.

### 2.3. INCORPORACIÓN DE PALMITATO A LÍPIDOS INTRACELULARES EN CÉLULAS L6E9 INFECTADAS CON Ad-FAT/CD36

Con el objetivo de evaluar los efectos en el metabolismo de lípidos a largo plazo de la sobreexpresión de la FAT/CD36, así como evaluar la funcionalidad de la proteína sobreexpresada se realizaron experimentos de incorporación de palmitato radiactivo a células L6E9 infectadas con cantidades crecientes de Ad-FAT/CD36 (fig. 24).

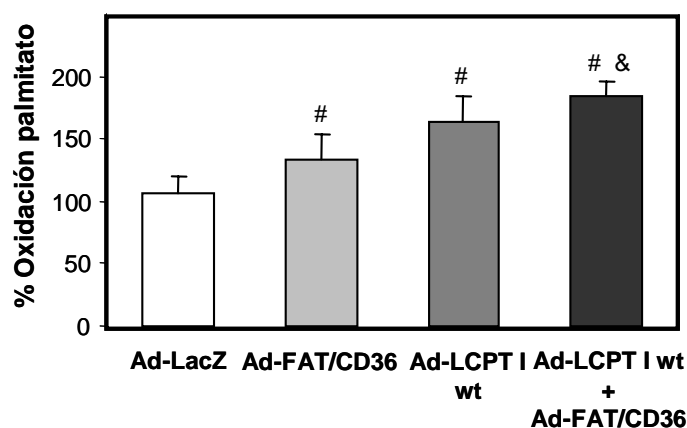
La sobreexpresión de FAT/CD36 provocó un aumento de aproximadamente el 50% en la incorporación de palmitato a lípidos celulares, como TG, DAG, PL y palNE. Estos resultados indican que la sobreexpresión de FAT/CD36 aumenta la captación de palmitato y éste es incorporado a los lípidos celulares. Exceptuando el caso del palNE, no se observan diferencias en la incorporación de palmitato entre las tres cantidades de virus utilizadas.



**Fig. 24. Incorporación de palmitato a lípidos celulares en células L6E9 infectadas con Ad-FAT/CD36.** Las células se infectaron con diferentes cantidades de virus y se incubaron 16 h con DMEM 0,25 mM [1-<sup>14</sup>C]-palmitato. Se extrajeron los lípidos intracelulares y se separaron mediante una cromatografía en capa fina. La intensidad de cada banda se cuantificó utilizando el sistema de escáner Storm 840. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al control Ad-LacZ y son la media  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes realizados por duplicado. \* $P < 0,01$  y # $P < 0,001$  respecto Ad-LacZ

#### 2.4. EFECTO DE LA SOBREENPRESIÓN DE FAT/CD36 EN LA OXIDACIÓN DE PALMITATO EN CÉLULAS L6E9

Una vez verificada la funcionalidad de la proteína sobreexpresada se procedió a analizar la implicación de la FAT/CD36 en la oxidación de ácidos grasos. Para ello se infectaron células L6E9 con 5 pfu/cel de Ad-FAT/CD36 y se determinó la oxidación de palmitato a CO<sub>2</sub>. Además, con el objetivo de evaluar si la FAT/CD36 estaba cooperando con la CPT I en la oxidación de palmitato, se sobreexpresaron ambas enzimas conjuntamente y se determinó la oxidación de palmitato (fig. 25).



**Fig. 25. Oxidación de palmitato en células L6E9 infectadas con Ad-FAT/CD36, Ad-LCPT I wt o ambos adenovirus.** Las células fueron infectadas con 5 pfu/cel de Ad-FAT/CD36 y 20 pfu/cel de Ad-LCPT I wt y Ad-LacZ tal y como se ha descrito en Materiales y Métodos y se midió la oxidación de palmitato a CO<sub>2</sub> durante 3 h. Los resultados se expresan como la media ± SD de tres experimentos independientes realizados en duplicado. #*P*<0,01 respecto Ad-LacZ y &*P*<0,01 respecto Ad-FAT/CD36.

La sobreexpresión de FAT/CD36 produjo un incremento del 30% en la oxidación de palmitato a CO<sub>2</sub>. La sobreexpresión de la LCPT I elevó la oxidación de palmitato un 60%, consistente con los resultados obtenidos la sección 1.4. La co-sobreexpresión de ambas proteínas, FAT/CD36 y LCPT I wt, produjo un aumento del 80% en la oxidación de palmitato, no observándose pues un efecto sinérgico de cooperatividad entre ambas proteínas. Así, la diferencia en la oxidación provocada por la sobreexpresión de FAT/CD36 respecto al control se mantiene prácticamente igual a la provocada por la sobreexpresión de FAT/CD36 y LCPT I wt respecto LCPT I wt sólo (30% frente 20%).

### 3. EFECTO DEL C75 EN LA ACTIVIDAD CPT I Y EN LA OXIDACIÓN DE PALMITATO EN CÉLULAS MUSCULARES L6E9

El C75 es un inhibidor sintético y estable de la ácido graso sintasa (FAS), y se ha descrito que puede actuar a nivel de sistema nervioso central reduciendo la ingesta y a nivel periférico estimulando la actividad CPT I<sup>11,12</sup> y estimulando la oxidación de palmitato, conduciendo a una pérdida de peso reduciendo la masa grasa en ratones. Cuando el C75 inhibe la FAS se incrementan los niveles de malonil-CoA, uno de los sustratos del enzima. Esta subida en los niveles de malonil-CoA debería inhibir la CPT I, pero paradójicamente ocurre lo contrario, es decir, se activa la CPT I en tejidos periféricos como hígado y tejido adiposo. Por otro lado, la cerulenina, otro inhibidor de la FAS a partir del cual se diseñó el C75, inhibe la actividad CPT I *in vivo* e *in vitro* y con ello la oxidación de palmitato<sup>13,14</sup>.

Debido a la importancia del músculo en el metabolismo energético y en la oxidación de ácidos grasos, hemos querido estudiar el efecto de la interacción entre el C75 y la CPT I en músculo, donde la expresión de la FAS es baja, y por lo tanto se podrá evaluar más directamente esta interacción.

#### 3.1. ANÁLISIS DEL C75-CoA POR MALDI-TOF

Estudios realizados en nuestro grupo<sup>15</sup> han demostrado que el C75 por sí mismo es sólo capaz de activar un 15% la actividad L-CPT I y M-CPT I sobreexpresadas en levadura. Debido a que muchos fármacos necesitan ser transformados en el organismo para ser activos, se pensó que quizás podría pasar lo mismo con el C75. Una de estas

---

<sup>11</sup> Thupari JN, Landree LE, Ronnett GV, Kuhajda FP. C75 increases peripheral energy utilization and fatty acid oxidation in diet-induced obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:9498-9502, 2002

<sup>12</sup> Yang N, Kays JS, Skillman TR, Burris L, Seng TW, Hammond C. C75 activates carnitine palmitoyltransferase-1 in isolated mitochondria and intact cells without displacement of bound malonyl-CoA. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2005, 312:127-133

<sup>13</sup> Thupari JN, Pinn ML, Kuhajda FP. Fatty acid oxidation in human breast cancer cells leads to malonyl-CoA-induced inhibition of fatty acid oxidation and cytotoxicity. *BBRC.* 2001,285:217-223.

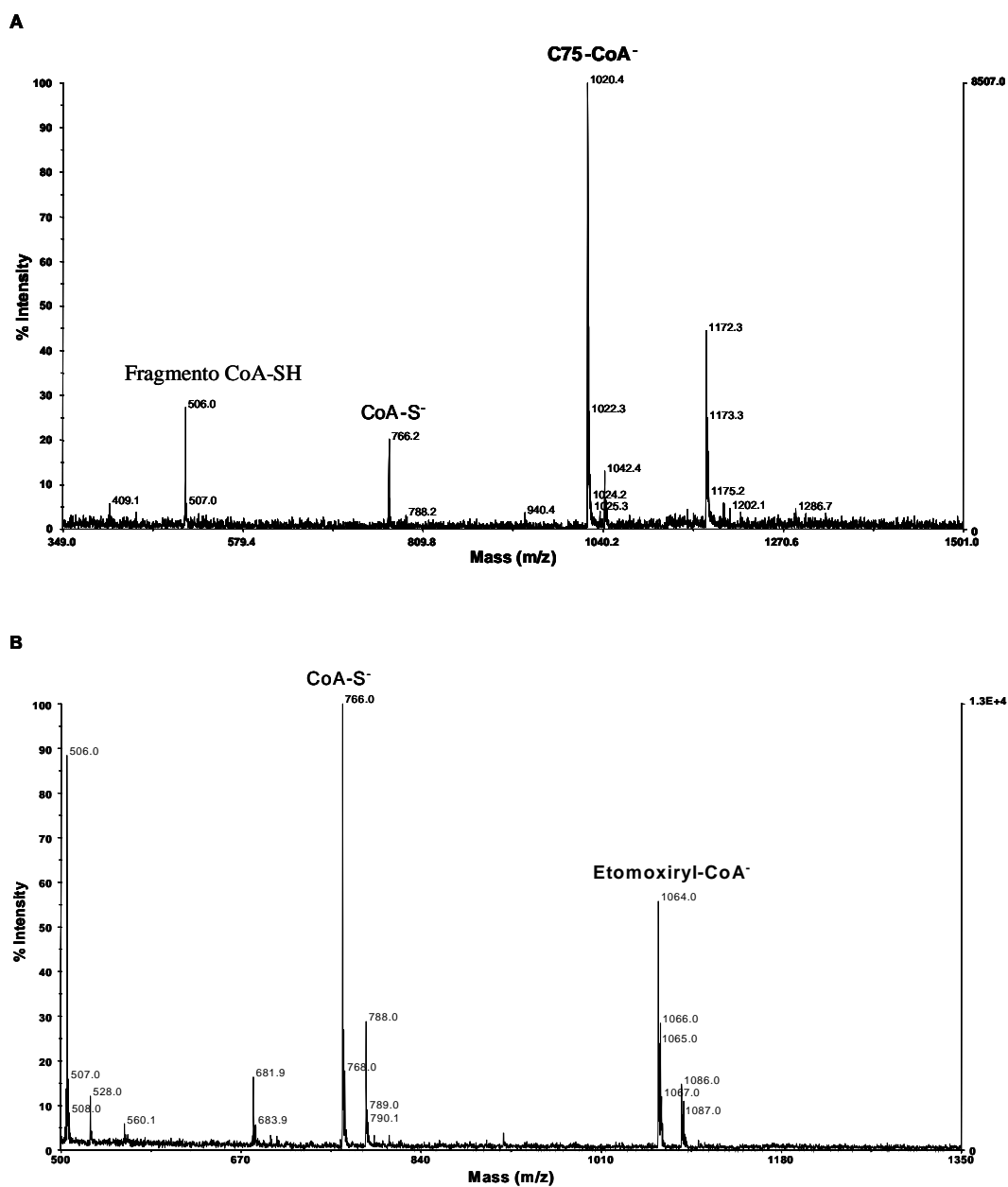
<sup>14</sup> Jin YJ, Li SZ, An JJ, Kim RY, Kim YM, Baik JH, Lim SK. Carinitne palmitoyltransferase-1 (CPT-1) activity stimulation by cerulenin via sympathetic nervous system activation overrides cerulenin's peripheral effect. *Endocrinology.* 2004;145:3197-3204

<sup>15</sup> Bentebibel A, Sebastián D, Herrero L, Lopez-Viñas E, Serra D, Asins G, Gomez-Puertas P, Hegardt FG. A novel effect of C75 on carnitine palmitoyltransferase and palmitate oxidation. *Biochemistry* 2006, In press.

transformaciones es llevada a cabo por acil-CoA sintetetas, que transforman el fármaco en cuestión en un derivado unido al coenzima A (CoA). Esto ocurre con un inhibidor irreversible de la CPT I, el etomoxir, que necesita ser transformado a etomoxiril-CoA<sup>16</sup> para ser activo. Por este motivo se pensó en comprobar si el C75 podía ser transformado a C75-CoA y si una vez convertido en su derivado CoA podía tener un mayor efecto sobre la actividad CPT I. Para ello se incubó C75 con coenzima A en presencia de una acil-CoA sintetasa de *Pseudomonas*. Para confirmar si el C75 había reaccionado con el coenzima A para dar lugar al C75-CoA se realizó un análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF. Este estudio confirmó la presencia de un compuesto del tamaño esperado para el producto C75-CoA (fig. 26A, pico de 1024,4 Da). El mismo análisis se llevó a cabo con el etomoxir (fig. 26B) como control, ya que es sabido que el etomoxir sí que se transforma a etomoxiril-CoA. El resto de los picos observados en el espectro corresponden a la matriz usada en el análisis, al CoA-SH en exceso o a productos provenientes de su fragmentación.

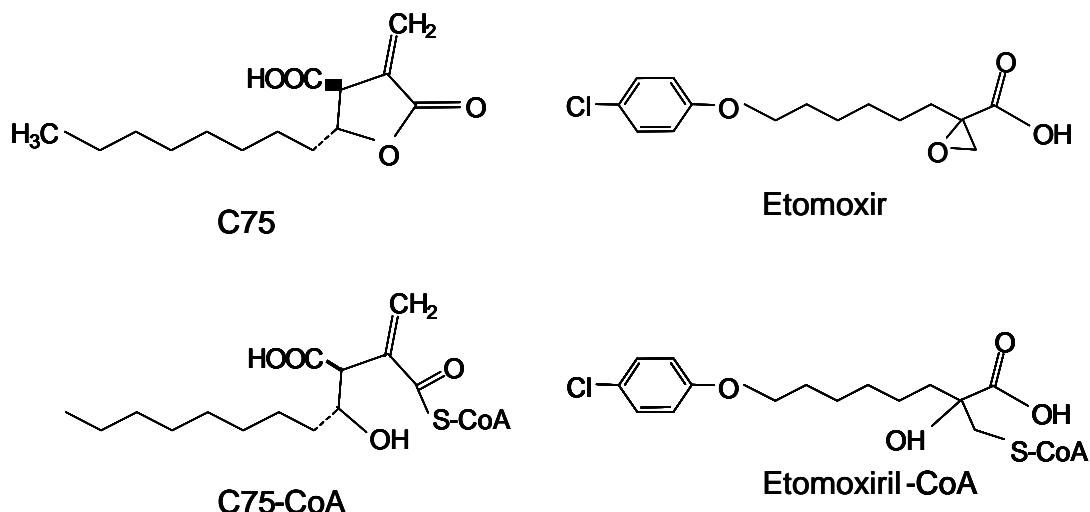
---

<sup>16</sup> Weis BC, Cowan AT, Brown N, Foster DW, McGarry JD. Use of a selective inhibitor of liver carnitine palmitoyltransferase I (CPT I) allows quantification of its contribution to total CPT I activity in rat heart. Evidence that the dominant cardiac CPT I isoform is identical to the skeletal muscle enzyme. *J. Biol. Chem.* 1994, 269:26446-26448



**Fig. 26.** Espectro de MALDI-TOF del C75-CoA y etomoxiril-CoA. Los espectros se obtuvieron directamente a partir de la mezcla de la reacción de activación del C75-CoA y etomoxiril-CoA usando un sistema Voyager-DE-RP de Applied Biosystems con DHB (10 mg/ml en agua:metanol 1:1) tal y como se ha descrito en Materiales y Métodos (sección 11). La detección se llevó a cabo con un reflector y en el modo negativo. El producto C75-CoA (A) corresponde al pico de 1020,4 Da y el etomoxiril-CoA (B) corresponde al pico de 1064,0 Da.

El tamaño de los productos obtenidos para el C75-CoA y etomoxiril-CoA confirmó además que el enlace con el CoA-SH era sólo posible abriendo el anillo de furano para el caso del C75 y por el epóxido en el caso del etomoxir y no a través del grupo carboxílico, que hubiera comportado la pérdida de una molécula de agua y por lo tanto otro peso molecular (ver fig. 27).



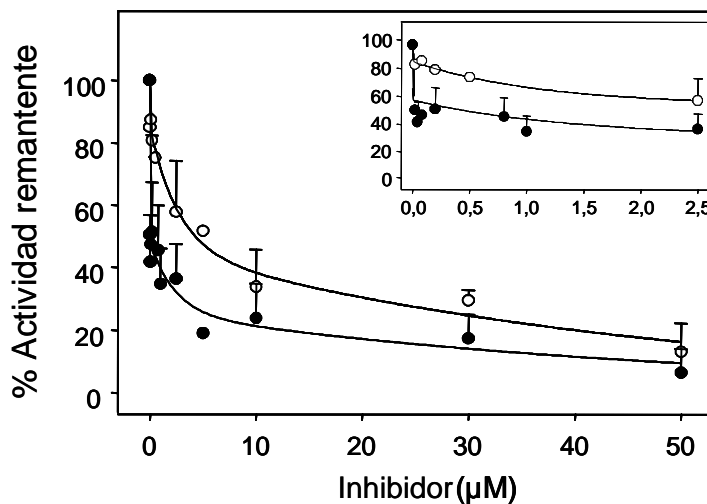
**Fig. 27. Estructuras propuestas para el C75-CoA y etomoxiril-CoA.** Estructuras químicas propuestas para el C75-CoA y etomoxiril-CoA de acuerdo con las masas obtenidas por MALDI-TOF para estos compuestos.

### 3.2. EFECTO DEL C75 EN LA ACTIVIDAD CPT I EN CÉLULAS L6E9 Y EN FRACCIONES ENRIQUECIDAS EN MITOCONDRIAS

Para estudiar el efecto del C75 en la actividad CPT I en músculo, las células L6E9 se incubaron con C75 y se determinó la actividad CPT I.

Para estudiar el efecto del C75 directamente sobre la CPT I, se obtuvieron fracciones enriquecidas en mitocondrias de células L6E9, se preincubaron durante 1 min con cantidades crecientes de C75-CoA y etomoxiril-CoA y se determinó la actividad CPT I. Como se muestra en la fig. 28, el C75-CoA inhibió la actividad CPT I con una cinética similar al etomoxiril-CoA. Así, a 50  $\mu\text{M}$  de cada fármaco la actividad CPT I se inhibió casi completamente. Los valores de  $\text{IC}_{50}$  para el etomoxiril-CoA y el C75-CoA fueron 2,87 y 0,46  $\mu\text{M}$  respectivamente. Por lo tanto, *in vitro* el C75-CoA se comporta

como un inhibidor de la CPT I, y su poder inhibitorio es incluso más potente que el del etomoxiril-CoA.

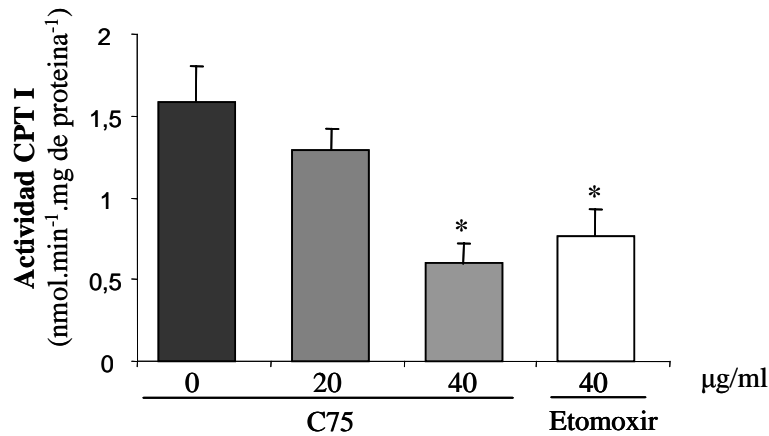


**Fig. 28. Efecto del C75-CoA y etomoxiril-CoA en la actividad CPT I.** Se obtuvieron fracciones enriquecidas en mitocondrias de células L6E9, se preincubaron durante 1 min con cantidades crecientes de C75-CoA (círculos negros) y etomoxiril-CoA (círculos blancos) y se determinó la actividad CPT I con 10 µg de proteína. Los resultados son la media  $\pm$  SEM de tres experimentos y se expresan como porcentajes relativos al control sin inhibidor (100% de actividad).

Para estudiar el efecto del C75 en la actividad CPT I directamente en células, las células L6E9 se crecieron en placas de 15 cm de diámetro y se incubaron 2 h en medio de diferenciación con 0, 20 y 40 µg/ml de C75 o con 40 µg/ml de etomoxir como control. En este caso no fue necesario activar los fármacos a sus derivados CoA ya que probablemente esta activación se dará en el interior de las células por acción de las aciles-CoA sintetasas intracelulares. Después se obtuvieron las fracciones enriquecidas en mitocondrias y se determinó la actividad CPT I.

La fig. 29 muestra una inhibición de la actividad CPT I a concentraciones crecientes de C75. La actividad se redujo un 20% y un 62% con 20 y 40 µg/ml de C75 respectivamente, y un 52% con 40 µg/ml de etomoxir. Así, en células de músculo esquelético, el C75 se comportó como un inhibidor de la CPT I.





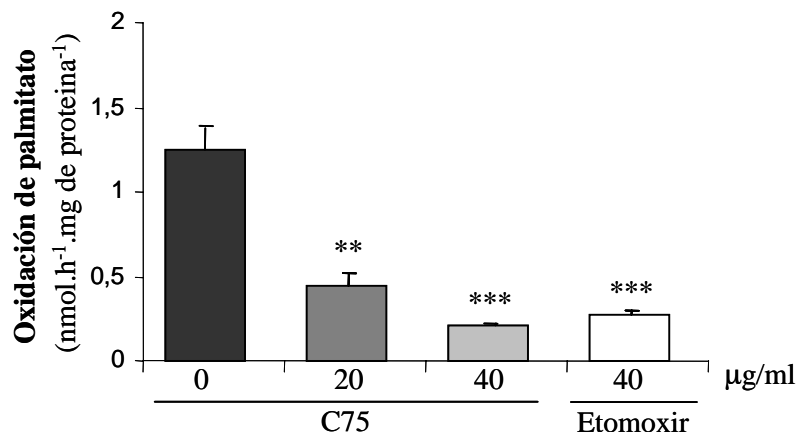
**Fig. 29. Actividad CPT I en células L6E9 incubadas con C75.** Las células L6E9 se crecieron en placas de 15 cm de diámetro y se incubaron 2 h en medio de diferenciación con 0, 20 y 40 µg/ml de C75 o con 40 µg/ml de etomoxir como control. Se obtuvieron fracciones enriquecidas en mitocondrias y se realizó el ensayo de actividad CPT I con 10 µg de proteína. Los resultados se expresan como la media ± SEM de tres experimentos realizados en duplicado. \* $P < 0,05$  respecto a control sin C75.

### 3.3. EFECTO DEL C75 EN LA OXIDACIÓN DE PALMITATO EN CÉLULAS L6E9

Para comprobar si la inhibición de la actividad CPT I por el C75 en células L6E9 iba seguida de una disminución en la oxidación de ácidos grasos, las células se incubaron con C75 o etomoxir como control y se determinó la oxidación de palmitato.

Las células se crecieron en placas de 12 pocillos y se incubaron 2 h en medio de diferenciación con 0, 20 y 40 µg/ml de C75 o con 40 µg/ml de etomoxir como control. Después las células se incubaron 30 min con KRBH 1% BSA y se determinó la oxidación de palmitato a CO<sub>2</sub> durante 2 h en presencia de 2,5 mM glucosa y [1-<sup>14</sup>C]palmitato.

La fig. 30 muestra que la oxidación de palmitato disminuyó un 66% y un 84% con 20 y 40 µg/ml de C75 respectivamente, y un 78% con 40 µg/ml de etomoxir. Por lo tanto el C75 inhibió la oxidación de palmitato en células L6E9 en concordancia con la inhibición de la actividad CPT I.



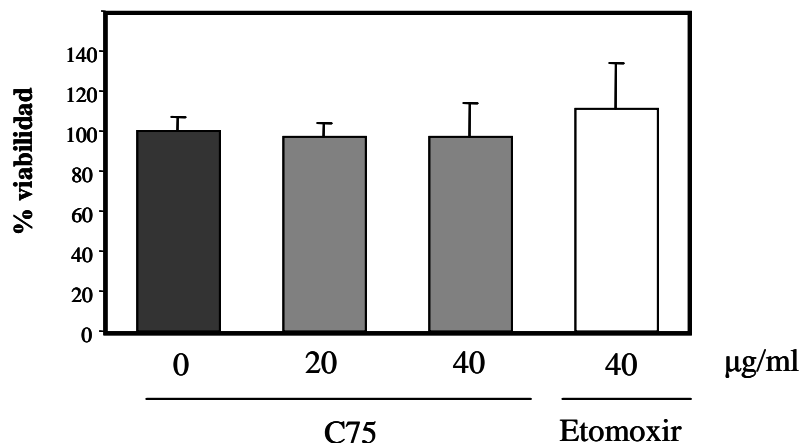
**Fig. 30. Oxidación de palmitato en células L6E9 tratadas con C75.** Las células se crecieron en placas de 12 pocillos y se incubaron 2 h en medio de diferenciación con 0, 20 y 40 µg/ml de C75 o con 40 µg/ml de etomoxir como control. Después las células se incubaron 30 min con KRBH 1% BSA y se determinó la oxidación de palmitato a CO<sub>2</sub> durante 2 h en presencia de 2,5 mM glucosa, 0,8 mM carnitina, 0,25 mM palmitato y 1 µCi/ml [1-<sup>14</sup>C]palmitato. Los resultados son la media ± SEM de cinco experimentos realizados en duplicado. \*\**P*<0,01, \*\*\**P*<0,001 respecto a control sin C75.

### 3.4. VIABILIDAD CELULAR

Para excluir la posibilidad que la inhibición de la oxidación de palmitato causada por el C75 fuera debida a un efecto citotóxico de éste, se llevaron a cabo experimentos de viabilidad celular usando el reactivo MTT.

Las células L6E9 se incubaron 2 h con medio de diferenciación y con 0, 20 y 40 µg/ml de C75 o 40 µg/ml de etomoxir. Después las células se incubaron 2 h más con la solución de MTT tal y como se ha descrito en Materiales y Métodos (sección 2.5). Los resultados se expresan como porcentaje respecto a las células control incubadas únicamente con DMSO.

La figura 31 muestra que en todos los casos la viabilidad celular fue superior al 98% del control, con lo cual la incubación con C75 no causó ningún efecto citotóxico en las células, concluyéndose que la disminución de la oxidación de palmitato fue debida al efecto inhibitorio del C75 sobre la CPT I.

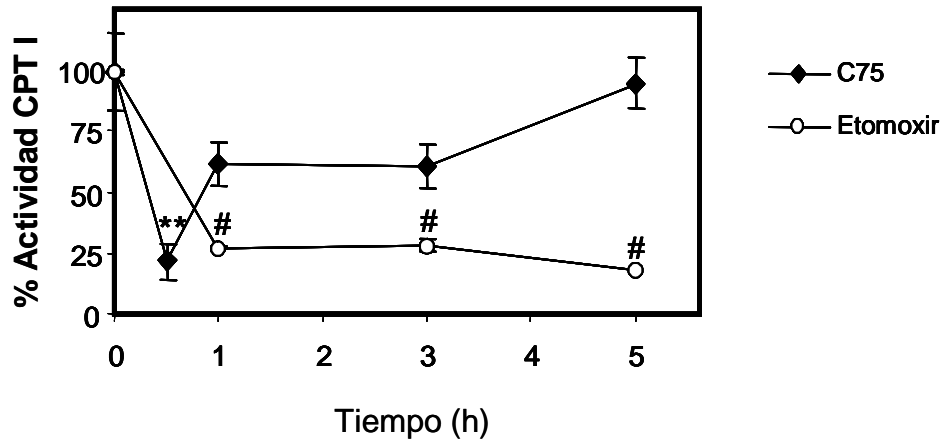


**Fig. 31. Viabilidad celular en células L6E9 tratadas con C75.** Las células se crecieron en placas de 12 pocillos y se incubaron 2 h en medio de diferenciación con 0, 20 y 40 µg/ml de C75 o con 40 µg/ml de etomoxir como control. Después las células se incubaron 2 h con solución MTT tal y como se ha descrito en Materiales y Métodos y los cristales de formazán formados se cuantificaron midiendo la absorbancia a 570 nm. Los resultados se expresan como el porcentaje de absorbancia respecto de la células control y son la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes.

### 3.5. EFECTO DEL C75 *IN VIVO* EN MÚSCULO DE RATÓN

Para examinar el efecto del C75 sobre la actividad CPT I *in vivo*, el C75 y el etomoxir se inyectaron intraperitonealmente por separado en ratones a una concentración de 20 mg/kg peso disuelto en medio RPMI 1640. Los ratones se sacrificaron a 0,5, 1, 3 y 5 h tras la inyección y se obtuvieron fracciones enriquecidas en mitocondrias de músculo para ensayar la actividad CPT I.

La figura 32 muestra que la actividad CPT I se inhibe en un 80% a los 30 min, recuperándose totalmente después de este tiempo. Para el caso del etomoxir, la actividad CPT I se inhibe también un 80% durante la primera hora pero esta inhibición perdura en el tiempo, consistente con el hecho que el etomoxir se une covalentemente a la CPT I. Así, los experimentos *in vivo* corroboran los experimentos realizados en células y demuestran que el C75 se comporta como un inhibidor de la CPT I.



**Fig. 32. Efecto del C75 en la actividad CPT I en músculo de ratón.** El C75 y el etomoxir se inyectaron intraperitonealmente a una concentración de 20 mg/kg de peso corporal y los animales fueron sacrificados 0,5, 1, 3, y 5 h después. Se obtuvieron fracciones enriquecidas en mitocondrias y se ensayó la actividad CPT I con 20  $\mu$ g de proteína. Los resultados son la media  $\pm$  SEM de 6 ratones. \*\* $P < 0,01$ , # $P < 0,001$  respecto control (0 h).

## **DISCUSIÓN**



## DISCUSIÓN

### 1. EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE LCPT I EN LA RESISTENCIA A LA INSULINA INDUCIDA POR ÁCIDOS GRASOS EN MÚSCULO ESQUELÉTICO

El músculo esquelético es el máximo responsable del metabolismo de la glucosa en situaciones de estimulación por insulina, participando en casi el 80% de su captación e incorporación a glucógeno. En los últimos años se ha relacionado la resistencia a la insulina con la acumulación de lípidos en tejidos periféricos no preparados para ello, entre ellos el músculo esquelético<sup>1</sup>. Esto confiere al músculo esquelético una vital importancia en el desarrollo de la resistencia a la insulina así como en el tratamiento de la diabetes de tipo 2.

En este estudio nos hemos planteado si una oxidación incrementada de ácidos grasos en músculo sería capaz de evitar esta acumulación de sus derivados lipídicos y la resistencia a la insulina ocasionada por éstos.

#### 1.1. CARACTERIZACIÓN DEL MODELO DE ESTUDIO

Para determinar los efectos de una capacidad de oxidación de ácidos grasos aumentada en la resistencia a la insulina inducida por ácidos grasos, se ha sobreexpresado la enzima responsable del control de la  $\beta$ -oxidación mitocondrial, LCPT I, utilizando adenovirus recombinantes. Se han utilizado células de músculo esquelético de rata L6E9 debido a su buena respuesta a insulina en términos de captación de glucosa y síntesis de glucógeno, además de presentar pérdida de sensibilidad a la insulina en presencia de concentraciones moderadas (0,15-0,25 mM) de palmitato.

Estudios recientes han demostrado que en diferentes líneas celulares de músculo, entre ellas las células L6 y C2C12, la isoforma de CPT I expresada es la LCPT I, en

---

<sup>1</sup> McGarry JD. Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002, 51:7-18

lugar de MCPT I como sería de esperar<sup>2</sup>. Esta observación es similar a lo observado en preadipocitos diferenciados *in vitro*, donde la MCPT I se expresa de forma minoritaria, mientras que en adipocitos maduros *in vivo* es la forma mayoritaria<sup>3</sup>. Esto sugiere que la expresión de esta proteína depende de factores que no están en las condiciones de cultivo de ninguna de estas células. En las células L6E9 ocurre lo mismo. Estudios de western blot usando anticuerpos específicos contra MCPT I no han sido capaces de detectar ninguna banda, en cambio, mediante el uso de anticuerpos contra LCPT I se aprecia una banda con el peso molecular adecuado. Esto demuestra que en las células utilizadas en este estudio, al igual que ha sido demostrado en otros casos, se expresa la LCPT I.

En el transcurso de esta tesis, fue publicado un trabajo en el cual se sobreexpresaba la LCPT I en células de músculo L6<sup>2</sup>, incrementando la oxidación de palmitato y con ello mejorando el metabolismo de glucosa estimulado por insulina, protegiendo contra la resistencia a la insulina inducida por ácidos grasos. Sorprendentemente, este efecto era independiente de la bajada de lípidos intracelulares. Por este motivo, para evaluar si el hecho de que los lípidos intracelulares no disminuyesen en el estudio anterior podía ser debido a un insuficiente incremento en la oxidación de ácidos grasos, en nuestro estudio se ha decidido sobreexpresar además de la isoforma hepática de CPT I, una forma mutada insensible al malonil-CoA, la L-CPT I M593S, con la que pensamos sería posible potenciar aún más los efectos en la oxidación de palmitato. Para ello se utilizaron dos adenovirus, Ad-LCPT I wt y Ad-LCPT I M593S previamente obtenidos y utilizados en nuestro grupo<sup>4,5</sup>.

Se ha evaluado la capacidad de los adenovirus que codifican para ambas formas de CPT I (Ad-LCPT I wt y Ad-LCPT I M593S) de incrementar los niveles de proteína y de actividad CPT I en células L6E9. Ambos adenovirus incrementaron los niveles de

---

<sup>2</sup> Perdomo G, Commerford RS, Richard AM, Adams SH, Corkey BE, O'Doherty RM, Brown NF. Increased B-oxidation in muscle cells enhances insulin stimulated glucose metabolism and protects against fatty acid induced insulin resistance despite intramyocellular lipid accumulation. *J Biol Chem* 2004, 279:27177-27186

<sup>3</sup> Brown NF, Hill JK, Esser V, Kirkland JL, Corkey BE, Foster DW, McGarry JD. *Biochem J* 1997, 327:225-231

<sup>4</sup> Rubi B, Antinozzi PA, Herrero L, Ishihara H, Asins G, Serra D, Wollheim CB, Maechler P, Hegardt FG. Adenovirus-mediated overexpression of liver carnitine palmyltransferase I in INS-1E cells: effects on cell metabolism and insulin secretion. *Biochem. J.* (2002) 219-226

<sup>5</sup> Herrero L, Rubi B, Sebastián D, Serra D, Asins G, Maechler P, Prentki M, Hegardt FG. Alteration of the malonyl-CoA/carnitine palmitoyltransferase I interaction in the  $\beta$ -cell impairs glucose-induced insulin secretion. *Diabetes* (2005) 54, 462-471



proteína y de actividad CPT I de forma proporcional a la cantidad de virus utilizada, sin llegarse a un efecto de saturación, indicando que esta metodología se ha mostrado excelente para sobreexpresar la proteína en estas células. Esto contrasta con los resultados obtenidos previamente en nuestro grupo en células  $\beta$ -pancreáticas INS(832/13)<sup>5</sup>, donde la sobreexpresión de ambos virus provocaba un aumento en la actividad CPT I que se saturaba a 9-10 veces más actividad CPT I. En este estudio, la sobreexpresión de la CPT I ha llevado a incrementos de 20-25 veces en la actividad CPT I sin apreciarse ningún efecto de saturación. Al elevar más las cantidades de virus aparecía una citotoxicidad debido a las grandes cantidades de virus usadas. La CPT I sobreexpresada necesita insertarse correctamente en la membrana mitocondrial externa para ser activa. Es posible que en células INS(832/13), ya sea debido al número de mitocondrias o a su tamaño, el espacio para que la CPT I sobreexpresada se inserte sea menor. En células L6E9 diferenciadas, es posible que el número o el tamaño de las mitocondrias sea mayor, debido a la fusión de los miocitos para formar los miotubos, o a que el músculo es un tejido más oxidativo que el páncreas. De esta forma, la saturación de la actividad llega antes en células de páncreas que en células de músculo.

La pérdida de sensibilidad malonil-CoA de la forma mutada de LCPT I ha sido estudiada en levaduras que sobreexpresan la CPT I<sup>6</sup> y en células  $\beta$ <sup>5</sup>, pero nunca en células de músculo esquelético. En este estudio se ha observado que las células L6E9 que sobreexpresan la LCPT I M593S retuvieron el 95% de su actividad CPT I, mientras que aquellas que sobreexpresan la LCPT I wt la actividad CPT I se inhibió un 80%, confirmando la insensibilidad al malonil-CoA de la LCPT I M593S sobreexpresada en estas células.

## **1.2. EFECTOS DE LA SOBREEXPRESIÓN DE LCPT I SOBRE EL METABOLISMO DE ÁCIDOS GRASOS**

Para evaluar el impacto de la LCPT I mutada frente la LCPT wt en el metabolismo de ácidos grasos, se establecieron las condiciones de infección para que en ambos casos la actividad se elevase el mismo número de veces, ya que de esta forma,

---

<sup>6</sup> Morillas M, Gómez-Puertas P, Bentebibel A, Selles E, Casals N, Valencia A, Hegardt FG, Asins G, Serra D. Identification of conserved aminoacids residues in rat liver carnitine palmitoyltransferase I critical for malonyl-CoA inhibition. Mutation of methionine 593 abolishes malonyl-CoA inhibition. *J Biol Chem* 2003, 278:9058-9063

los posibles efectos extra que observásemos en la oxidación serían exclusivamente debidos a la insensibilidad al malonil-CoA de la LCPT I mutada.

La sobreexpresión de ambas formas de LCPT I provocó un aumento en la oxidación de palmitato a CO<sub>2</sub> respecto las células control sólo cuando la oxidación se midió a partir de las 2,5-3 h. Esto indica que es necesario este tiempo hasta que las moléculas de palmitato sean totalmente oxidadas, y sólo a partir de este tiempo vemos las diferencias debidas al mayor transporte de palmitato al interior de la mitocondria provocado por la sobreexpresión de la LCPT I. En cambio, para la oxidación de palmitato a productos solubles ácidos (ASPs), especies no totalmente oxidadas como acil-carnitina, acetil-CoA o intermediarios del ciclo de Krebs, las diferencias entre las células que sobreexpresan LCPT I y las células control se apreciaron a partir de la primera hora, ya que estas moléculas aparecen antes que el CO<sub>2</sub>, resultado de la total oxidación de la molécula de palmitato. Esto se ve reflejado en el hecho que a los 30 min no se aprecie apenas CO<sub>2</sub> liberado y en cambio aparezcan ya niveles significativos de ASPs. De estos experimentos se fijó el tiempo de oxidación a 3 horas para posteriores determinaciones.

El incremento en la oxidación de palmitato fué aproximadamente proporcional a la actividad CPT I hasta 3 veces más de actividad CPT I, llegándose a un incremento en la oxidación de 1,6 veces para la LCPT I wt y de 2 veces para la LCPT I M593S. Estos incrementos son similares a los obtenidos por Perdomo y colaboradores<sup>2</sup>, observando también una saturación de la oxidación de palmitato hasta un incremento de dos veces. Para posteriores experimentos se escogió la cantidad de virus que incrementó la actividad CPT I 3 veces puesto que los incrementos en la oxidación fueron máximos y no aumentaron significativamente con mayores cantidades de virus.

Aunque la actividad CPT I puede aumentar hasta 20 veces de forma lineal, la oxidación aumenta hasta un máximo de 2-2,5 veces, indicando que la funcionalidad de esta proteína sobreexpresada tiene un límite, presumiblemente por la presencia de otros mecanismos involucrados en la regulación de la oxidación de ácidos grasos en músculo esquelético. Recientemente se ha sugerido que otra proteína, la FAT/CD36, podría estar involucrada en el transporte de ácidos grasos al interior de la mitocondria cooperando

con CPT I<sup>7</sup>. Esta posibilidad se analizará en más detalle posteriormente. Otro factor situado por debajo de la CPT I, la  $\beta$ -cetoacil-CoA tiolasa, también ha sido descrito que puede ejercer un papel importante en el control de la  $\beta$ -oxidación<sup>8</sup>. Así, es posible que otros factores aparte de la CPT I controlen la oxidación de ácidos grasos en músculo esquelético.

Esto no ocurre en células  $\beta$ , donde la sobreexpresión de la LCPT I M593S para un aumento de 6 veces en la actividad CPT I provoca un aumento de 4 veces en la oxidación de palmitato<sup>5</sup>, sugiriendo que el papel de CPT I en la regulación de la oxidación de ácidos grasos en ambos tipos celulares es diferente. Esto es consistente con las peculiaridades metabólicas del músculo esquelético, donde la oxidación de ácidos grasos está finamente controlada<sup>9</sup>.

La oxidación de palmitato disminuyó al aumentar la cantidad de glucosa de 2,5 a 15 y 25 mM, consistente con el ciclo de la glucosa-ácidos grasos. Esto demuestra que la sobreexpresión de CPT I no afecta a los procesos celulares que conllevan a esta regulación. En la misma línea, el hecho que la oxidación de octanoato, un ácido graso de cadena media que entra en la mitocondria independientemente de CPT I, no aumente tras la sobreexpresión de CPT I, indica que el metabolismo oxidativo mitocondrial no se ve afectado por la sobreexpresión de CPT I.

Al aumentar la concentración de glucosa, los niveles de malonil-CoA intracelulares aumentan. Así, los niveles de malonil-CoA conseguidos tras la presencia de 25 mM glucosa son suficientes para inhibir en un 40% la oxidación de palmitato en las células control y que sobreexpresan LCPT I.

La sobreexpresión de LCPT I M593S provoca un mayor incremento en la oxidación de palmitato que la de LCPT I wt respecto el control. Las diferencias entre la oxidación en células que sobreexpresan LCPT I M593S y LCPT I wt son de un 30% sólo a altas concentraciones de glucosa, mostrando que sólo cuando los niveles de malonil-CoA son elevados, la LCPT I mutada ejerce su efecto. Sin embargo, en estas células, la insensibilidad al malonil-CoA de la LCPT I mutada provoca sólo un

---

<sup>7</sup> Campbell SE, Tandon NN, Woldegiorgis G, Luiken JJ, Glatz JF, Bonen A. A novel function for fatty acid translocase FAT/CD36: involvement in long chain fatty acid transfer into the mitochondria. *J Biol Chem* 2004, 279:36235-36241

<sup>8</sup> Liang X, Le W, Zhang D, Schulz H. Impact of the intramitochondrial enzyme organization of fatty acid oxidation. *Biochem Soc Trans* 2001, 29:279-282

<sup>9</sup> Jeukendrup AE. Regulation of fat metabolism in skeletal muscle. *Annals New York Acad Sci* 2002, 967:217-235

incremento del 30% en la oxidación de palmitato. En un estudio anterior llevado a cabo en células INS(832/13) la LCPT I mutada era capaz de producir un incremento del 100% respecto la LCPT I wt<sup>5</sup>. Estos datos, junto con el hecho que por más que se eleve la actividad CPT I la oxidación no incremente más de 2 veces, sugieren que la regulación de la oxidación de ácidos grasos en las células L6E9 es diferente que en las células INS(832/13), existiendo probablemente otros factores independientes del malonil-CoA que ejercen un papel importante en esta regulación.

La sobreexpresión de LCPT I afecta exclusivamente a la oxidación de los ácidos grasos de cadena larga, como el palmitato, pero no a los ácidos grasos de cadena media, tal y como se observa en los experimentos de oxidación de octanoato. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Perdomo y colaboradores<sup>2</sup> que no observaron ninguna alteración en la oxidación de octanoato tras la sobreexpresión de LCPT I. Esto indica que los efectos observados en la oxidación de palmitato son debidos exclusivamente al aumento de su transporte al interior de la mitocondria, y no a un incremento en su metabolismo en el interior de la mitocondria.

Además de un aumento en la  $\beta$ -oxidación, la sobreexpresión de LCPT I debería provocar una menor utilización de los ácidos grasos para la síntesis de compuestos lipídicos. Esta hipótesis se ha verificado en este estudio tanto con LCPT I wt como con LCPT I M593S, demostrándose una menor incorporación de palmitato a TG, DAG, PL, y observándose una menor cantidad de palmitato no esterificado, una medida indirecta de los aciles-CoA de cadena larga<sup>10</sup>, consistente con los resultados obtenidos previamente por nuestro grupo en células INS(832/13)<sup>5</sup>. Estos resultados, junto con los obtenidos por Montell y colaboradores<sup>11</sup>, que demostraban una incorporación de palmitato a DAG tras la incubación de las células con este ácido graso, demuestran que la sobreexpresión de LCPT I bloquea esta incorporación de ácidos grasos a lípidos celulares. Esto se confirmó en este estudio analizando los niveles totales de DAG tras la incubación con palmitato durante 16 h. La sobreexpresión de LCPT I fue capaz de

---

<sup>10</sup> Roduit R, Nolan C, Alarcón C, Moore P, Barbeau A, Delghingaro-Augusto V, Przybykowski E, Morin J, Masse F, Massie B, Ruderman NB, Rodees C, Poitout V, Prentki M. A role for the malonyl-CoA/long-chain acyl-CoA pathway of lipid signalling in the regulation of insulin secretion in response to both fuel and nonfuel stimuli. *Diabetes* 2004, 53:1007-1019

<sup>11</sup> Montell E, Turini M, Marotta M, Roberts M, Noé V, Ciudad CJ, Macé K, Gómez-Foix AM. DAG accumulation from saturated fatty acids desensitizes insulin stimulation of glucose uptake in muscle cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2001, 280:E229-E237

bloquear el incremento de los niveles totales de DAG tras la incubación de las células con palmitato. El mismo efecto se observó con el aumento en los niveles de ceramidas, otro derivado lipídico involucrado en la resistencia a la insulina. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Perdomo y colaboradores<sup>2</sup>, que no observaron ningún cambio en los niveles de estas especies lipídicas tras la sobreexpresión de la LCPT I. Los autores atribuyen este efecto a la posible existencia de unos depósitos de aciles-CoA preferentes para la  $\beta$ -oxidación y otros para la síntesis de lípidos, de modo que el aumento en la  $\beta$ -oxidación disminuiría únicamente los depósitos oxidables sin afectar a los depósitos biosintéticos. Sin embargo, hay que destacar que en esos estudios no se hicieron experimentos de incorporación de palmitato a lípidos celulares, de modo que no es posible saber si en sus condiciones de trabajo la sobreexpresión de LCPT I fue capaz de decantar totalmente el metabolismo de ácidos grasos hacia una mayor oxidación y una menor esterificación, como se ha observado en esta tesis.

A diferencia del DAG y las ceramidas, que actúan como segundos mensajeros y pueden modular la actividad de proteínas quinasa, los TG constituyen una reserva energética, y su concentración se mantiene más estable, implicando otros mecanismos en el control de su concentración. Esto explicaría la ausencia de efecto de la sobreexpresión de LCPT I en los niveles totales de TG, tal y como se ha descrito en otros estudios<sup>2,4,5</sup>.

En conjunto, estos datos sugieren que la oxidación incrementada de ácidos grasos protege a la célula de la acumulación de lípidos tras la incubación con una cantidad elevada de palmitato durante 16 h. De esta forma, la célula está protegida del aumento en los niveles de lípidos importantes en la patogénesis de la resistencia a la insulina, como los aciles-CoA de cadena larga, el DAG y las ceramidas<sup>1</sup>.

### **1.3. EFECTO DE LOS ÁCIDOS GRASOS Y DE LA SOBREEXPRESIÓN DE LCPT I EN EL METABOLISMO DE GLUCOSA ESTIMULADO POR INSULINA**

En ausencia de palmitato, la sobreexpresión de LCPT I no provocó ningún cambio en el metabolismo de la glucosa estimulado por insulina, descartando cualquier interferencia entre una mayor expresión de LCPT I y el metabolismo de la glucosa. Es importante matizar que desde la infección de las células con los adenovirus hasta el día del experimento, éstas se incuban en un medio sin suero, siendo pues la presencia de ácidos grasos en el medio de cultivo casi nula. De este modo, debido a la ausencia de

sustrato, la LCPT I sobreexpresada se mantiene en reposo. Esto contrasta con los estudios de Perdomo y colaboradores<sup>2</sup>, donde en ausencia de la incubación con palmitato, la LCPT I sobreexpresada potenció sensiblemente el metabolismo de la glucosa estimulado por insulina. Es posible que las diferencias entre ambos estudios residan en el hecho que en éste último las células sólo se mantuvieron 4 h en un medio sin suero, de modo que los ácidos grasos presentes en el suero han podido provocar unos niveles de lípidos más altos en la célula que han podido interferir muy suavemente en la respuesta a la insulina sólo en aquellas células que no sobreexpresan LCPT I. Por este motivo, las células que sobreexpresan LCPT I pueden estar más sensibilizadas a la acción de la insulina.

La incubación de células de músculo con concentraciones elevadas de palmitato durante 16 h provoca una pérdida de sensibilidad a la insulina, observada en una menor captación de glucosa y síntesis de glucógeno estimulados por insulina. Esto se ha confirmado en este estudio, donde la incubación con 0,25 mM palmitato durante 16 h provoca un bloqueo total en la captación de glucosa y la síntesis de glucógeno estimulados por insulina en células L6E9. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros estudios, donde la incubación con palmitato indujo resistencia a la insulina en células L6<sup>2</sup>, C2C12<sup>12</sup> y células musculares humanas en cultivo<sup>11</sup>. En el primer caso, esta pérdida de sensibilidad a la insulina va asociada a la acumulación de DAG, ceramidas y aciles-CoA de cadena larga. En el segundo caso, la resistencia a la insulina inducida por palmitato va asociada únicamente a niveles incrementados de ceramidas, y el tercer caso a niveles elevados de DAG. En este trabajo, el palmitato induce resistencia a la insulina a través de una acumulación de DAG y ceramidas, y analizado de forma indirecta, es posible que también a través de aciles-CoA de cadena larga.

La sobreexpresión de LCPT I protege contra la resistencia a la insulina en estas células, ya que después del tratamiento con palmitato presentan una respuesta normal a la insulina. La sobreexpresión de ambas formas de LCPT I restaura totalmente tanto la captación de glucosa como la incorporación de glucosa a glucógeno estimulados por insulina. Esto es la primera vez que se demuestra, ya que en un estudio anterior<sup>2</sup>, la sobreexpresión de LCPT I únicamente produjo una ligerísima mejora en la sensibilidad

---

<sup>12</sup> Schmitz-Peiffer C, Craig DL, Biden TJ. Ceramide generation is sufficient to account for the inhibition of the insulin-stimulated PKB pathway in C2C12 skeletal muscle cells pretreated with palmitate. *J Biol Chem.* 1999, 274(34):24202-10.

a la insulina, que apenas llegó a diferencias significativas. Seguramente esto es debido a que en ese estudio, la sobreexpresión de LCPT I no fue capaz de bloquear los aumentos en los niveles de DAG y ceramidas, hecho que en el presente estudio se consigue. De este modo se establece una correlación directa entre los niveles de derivados lipídicos, como DAG y ceramidas, y la resistencia a la insulina en células L6E9.

Es sabido que una correcta oxidación de ácidos grasos es un proceso vital para el metabolismo muscular. Deficiencias en la oxidación de ácidos grasos se han relacionado con la resistencia a la insulina, la diabetes de tipo 2 y la obesidad<sup>13,14</sup>. Además, estas deficiencias eran provocadas por una menor actividad CPT I, indicando que la desregulación de esta proteína juega un papel muy importante en la aparición de la resistencia a la insulina y la diabetes de tipo 2.

La importancia de la CPT I en este proceso se ha demostrado indirectamente en estudios llevados a cabo en ratones knock-out en ACC2<sup>15</sup>. Esta proteína es la encargada de producir malonil-CoA en músculo, y este malonil-CoA inhibe la CPT I. Ratones cuya expresión de ACC2 ha sido bloqueada específicamente en músculo, presentan un efecto protector contra la resistencia a la insulina inducida por ácidos grasos. La explicación de este fenómeno subyace en el hecho que la actividad CPT I está aumentada debido a la falta de su inhibidor fisiológico, el malonil-CoA.

En este estudio se muestra que un incremento en la oxidación de ácidos grasos provocado directamente por una mayor actividad CPT I es capaz de revertir la resistencia a la insulina provocada por ácidos grasos en músculo esquelético, sugiriendo que la CPT I es una posible diana farmacológica para el tratamiento de la resistencia a la insulina y la diabetes de tipo 2.

---

<sup>13</sup> Kim JY, Hickner RC, Cortright RL, Dohm GL, Houmard JA. Lipid oxidation is reduced in obese human skeletal muscle. *Am J Physiol* 2000, 279:E1039-E1044

<sup>14</sup> Gaster M, Rustan AC, Ass V, Beck-Nielsen H. Reduced lipid oxidation in skeletal muscle from type 2 diabetic subjects may be of genetic origin: evidence from cultured myotubes. *Diabetes* 2004, 53:542-548

<sup>15</sup> Abu-Elheiga L, Oh W, Kordari P, Wakil SJ. Acetyl-CoA carboxylase 2 mutant mice are protected against obesity and diabetes induced by high-fat/high-carbohydrate diets. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, 100:10207-10212

#### 1.4. EFECTO DE LOS ÁCIDOS GRASOS Y LA SOBREENEXPRESIÓN DE LCPT I EN VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA

Se ha observado que la pérdida de sensibilidad a la insulina inducida por ácidos grasos cursa a través de la inhibición de la actividad PKB. El tratamiento con palmitato inhibe un 60% la actividad PKB estimulada por insulina. Ésta es una proteína clave en las acciones de la insulina sobre el transporte de glucosa y síntesis de glucógeno<sup>16</sup>, y su actividad puede ser inhibida por las ceramidas, ya sea directamente o a través de otras proteínas<sup>12</sup>. Una proteína involucrada en los efectos de la ceramida es la PKC  $\zeta$ , que es capaz de fosforilar e inhibir a la Akt/PKB. En un estudio llevado a cabo en células L6<sup>17</sup> se observó una activación de la PKC  $\zeta$  tras la incubación con palmitato y esto se correlacionaba directamente con la aparición de resistencia a la insulina en estas células. Además de sus efectos sobre la PKB, la PKC  $\zeta$  es capaz de fosforilar a IRS-1 en serinas, ya sea directamente<sup>18</sup> o a través de la activación de IKK $\beta$ <sup>19</sup>, interfiriendo con la señalización de la insulina. En nuestro trabajo, las células L6E9 tratadas con palmitato presentaron un aumento en la actividad PKC  $\zeta$  similar al observado para las ceramidas, y este incremento en la actividad quedó bloqueado tras la sobreexpresión de LCPT I. Sin embargo, aunque la sobreexpresión de LCPT I bloquea totalmente la activación de PKC  $\zeta$  y el incremento en ceramidas, la actividad PKB no es restaurada totalmente a los valores control. La sobreexpresión de LCPT I rescata sólo parcialmente la inhibición de la PKB por el palmitato, indicando que otros mecanismos independientes de las ceramidas están actuando inhibiendo la PKB.

Uno de estos mecanismos es llevado a cabo en estas células por el DAG. El DAG es capaz de activar a la PKC  $\theta$ , una serina quinasa que fosforila a IRS-1 en residuos de serina, interfiriendo con la fosforilación en residuos de tirosina necesarios

<sup>16</sup> Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest* 2000, 106:165-169

<sup>17</sup> Powell DJ, Turban S, Gray A, Hajduch E, Hundal HS. Intracellular ceramide synthesis and protein kinase C $\zeta$  activation play an essential role in palmitate-induced insulin resistance in rat L6 skeletal muscle cells. *Biochem J* 2004, 382:619-629

<sup>18</sup> Moeschel K, Beck A, Weigert C, Lammers R, Kalbacher H, Voelter W, Scheicher ED, Haring HU, Lohmann R. Protein kinase C-zeta-induced phosphorylation of Ser318 in insulin receptor substrate-1 (IRS-1) attenuates the interaction with the insulin receptor and the tyrosine phosphorylation of IRS-1. *J Biol Chem* 2004, 279:25157-24163

<sup>19</sup> Gao Z, Hwang G, Bataille F, Lefevre M, York D, Quon M, Ye J. Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex. *J Biol Chem* 2002, 277:48115-48121



para la transducción de la señal de la insulina<sup>20</sup>. El aumento observado de los niveles de DAG tras la incubación con palmitato provocó un aumento similar de la actividad PKC  $\theta$ , indicando la implicación de esta proteína en la pérdida de sensibilidad a la insulina observada en estas células. La importancia de esta serina quinasa en la resistencia a la insulina se ha confirmado en ratas perfundidas con lípidos, donde se ha encontrado un incremento de 4 veces en la actividad PKC  $\theta$ <sup>20</sup>. Además, se ha demostrado que ratones transgénicos con una inactivación de la PKC  $\theta$  están protegidos contra la resistencia a la insulina inducida por lípidos en músculo esquelético<sup>21</sup>. En nuestras manos, la sobreexpresión de LCPT I fue efectiva en bloquear totalmente la actividad PKC  $\theta$ , consistente con la disminución en los niveles de DAG.

Otro mecanismo es llevado a cabo por aciles-CoA de cadena larga, que pueden modular la fosforilación del IRS 1 en serinas a través de la ruta de las MAPK<sup>22</sup>, conduciendo a una menor actividad PI3K asociada y por lo tanto interfiriendo con la señalización de la insulina. En este trabajo no se ha estudiado esta vía, aunque en otros estudios llevados a cabo en células L6<sup>2</sup>, y C2C12<sup>12</sup> el palmitato fue capaz de activar la p38MAPK.

Recientemente se ha descrito que el palmitato induce la expresión del TNF $\alpha$  en células musculares C2C12, mediante un mecanismo dependiente de la activación de PKC  $\theta$  y NF- $\kappa$ B y que conlleva a una menor expresión de GLUT 4 y con ello una menor captación de glucosa estimulada por insulina<sup>23</sup>. El TNF $\alpha$  es una citoquina que ha sido relacionada con la resistencia a la insulina y la obesidad<sup>24</sup>, alterando la cascada de señalización de la insulina a nivel de IRS-1. De este modo, es posible que en las células

<sup>20</sup> Griffin ME, Marcuzzi MJ, Cline GW, Bell K, Barucci N, Lee D, Goodyear LJ, Kraegen EW, White MF, Shulman GI. Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase  $\theta$  and alterations in the insulin signalling cascade. *Diabetes* 1999, 48:1270-1274

<sup>21</sup> Kim JK, Fillmore JJ, Sunshine MJ, Albrecht B, Higashimori T, Kim DW, Liu ZX, Soos TJ, Cline GW, O'Brien WR, Littman DR, Shulman GI. PKC-theta knockout mice are protected from fat-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 2004, 114:823-827

<sup>22</sup> DeFea K, Roth RA. Protein kinase C modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation requires serine 612. *Biochemistry* 1997, 36:12939-12947

<sup>23</sup> Jove M, Planavila A, Sanchez RM, Merlos M, Laguna JC, Vázquez-Carrera M. Palmitate induces tumor necrosis factor  $\alpha$  expression in C2C12 skeletal muscle cells by a mechanism involving protein kinase C and nuclear factor- $\kappa$ B activation. *Endocrinology* 2006, 147:552-561

<sup>24</sup> Hotamisligil GS, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor  $\alpha$ : a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes* 1994, 43:777-784

L6E9 el palmitato esté también provocando estos efectos a través del TNF $\alpha$ , contribuyendo a la resistencia a la insulina.

Son necesarios más experimentos para elucidar todas las vías implicadas en la resistencia a la insulina inducida por palmitato en estas células. Sin embargo, aquí se ha demostrado por primera vez que la sobreexpresión de la LCPT I (tanto la forma salvaje como la forma mutada) impiden la acumulación de metabolitos derivados de ácidos grasos y la activación de PKC  $\theta$  y PKC  $\zeta$ , y con ello protegen a la célula de la resistencia a la insulina.

### **1.5. PAPEL DE LA FOSFORILACIÓN EN SERINAS DE IRS-1 EN LA RESISTENCIA A LA INSULINA INDUCIDA POR ÁCIDOS GRASOS**

Como se ha comentado anteriormente, el efecto nocivo de los ácidos grasos en la señalización de la insulina cursa a través de la activación de diferentes proteínas serina quinasa (JNK, IKK, PKC  $\theta$  y PKC  $\zeta$ ) que fosforilan a IRS-1 en determinadas serinas, interfiriendo con la señalización de la insulina. Debido a que estas quinasas son activadas por derivados lipídicos, en un estudio realizado a cabo durante mi estancia en el laboratorio del Prof. Gerald I. Shulman en la Universidad de Yale (ver Publicaciones) se evaluó el impacto de la mutación de estas serinas de IRS-1 en la resistencia a la insulina inducida por ácidos grasos. Se obtuvieron ratones transgénicos que sobreexpresaban específicamente en músculo un IRS-1 con tres serinas fosforilables por estas serina quinasas (Ser302, Ser307 y Ser612) mutadas a alanina. Estos ratones están protegidos de la resistencia a la insulina inducida por dieta grasa<sup>25</sup>, tal y como demostró la mayor captación de glucosa estimulada por insulina en músculo durante un clamp hiperinsulinémico-euglicémico. Además estos ratones presentaron un incremento en la actividad PI3K asociada a IRS-1 y una mayor fosforilación de PKB. Estos resultados demuestran que la fosforilación en serinas del IRS-1 juega un papel crucial en la resistencia a la insulina inducida por ácidos grasos, y al impedir esta fosforilación se protege el músculo contra esta resistencia a la insulina. Aunque en esta tesis no se ha evaluado esta fosforilación en serinas en células L6E9, los resultados obtenidos con los ratones transgénicos para IRS-1 mutado permiten especular que la falta de activación de

---

<sup>25</sup> Morino K, Neschen S, Bilz S, Sono S, Tsigotis D, Reznick R, Moore I, Samuel V, Sebastian D, Philbrik W, White MF, Shulman GI. IRS-1 Ser $\rightarrow$ Ala mutant mice are protected from fat-induced insulin resistance. Submitted, 2006

PKC  $\theta$  y PKC  $\zeta$  en células que sobreexpresan LCPT I esté protegiendo a la célula de la fosforilación en serinas de IRS-1. En conjunto, ya sea evitando la acumulación de derivados lipídicos de ácidos grasos (mediante la sobreexpresión de LCPT I) o impidiendo su efecto en su diana final (IRS-1 con las serinas mutadas a alanina) se evita la resistencia a la insulina inducida por ácidos grasos en músculo.

### **1.6. LA SOBREEXPRESIÓN DE LCPT I M593S NO OCASIONA NINGUNA MEJORA RESPECTO A LA SOBREEXPRESIÓN DE LCPT I wt**

En este trabajo se han utilizado dos formas de LCPT I, una forma salvaje y una forma mutada insensible al malonil-CoA. El objetivo era evaluar el impacto de sobreexpresar una LCPT I insensible al malonil-CoA y por lo tanto activa incluso a concentraciones de malonil-CoA elevadas. Sin embargo, a pesar de provocar un mayor incremento en la oxidación de ácidos grasos que la LCPT I wt no se ha visto ningún efecto extra en su capacidad de protección a la resistencia a la insulina.

Las células L6E9 derivan de las células L6. Estas células, aún siendo de músculo esquelético, expresan la isoforma hepática de la CPT I en lugar de la isoforma muscular, la MCPT I<sup>2</sup>. Este hecho es de vital importancia para el metabolismo de estas células, ya que la MCPT I es mucho más sensible al malonil-CoA que la LCPT I. Así, en estas células, incluso a concentraciones elevadas de malonil-CoA la LCPT I estará más activa que lo estaría la MCPT I. Por esta razón, la sobreexpresión de una forma insensible al malonil-CoA no tendría tanto efecto como el esperado.

Sin embargo, ha sido descrito que la sobreexpresión de MCPT I en estas células no provoca un aumento en la oxidación de palmitato<sup>2</sup>, y esto puede deberse a que los niveles de malonil-CoA de las células L6 sean más elevados de lo normal, y suficientes para mantener inhibida la MCPT I sobreexpresada. Podría ocurrir que la expresión de la LCPT I en lugar de la MCPT I en estas células de músculo fuera acompañada al mismo tiempo por una desregulación de los niveles de malonil-CoA.

Otra consideración importante es el hecho que en músculo hay otros factores aparte de la CPT I que controlan la oxidación de ácidos grasos. Además de la CPT I, recientemente se ha sugerido que FAT/CD36 podría jugar también un papel importante en el transporte de ácidos grasos al interior de la mitocondria<sup>7</sup>. El papel de esta proteína en las células L6E9 se discutirá más adelante.

Así, otros factores independientes del malonil-CoA podrían estar involucrados en la oxidación de ácidos grasos, con lo cual la sobreexpresión de la CPT I insensible a

malonil-CoA tendría sólo un efecto relativo en la regulación total de la oxidación de los ácidos grasos.

### **1.7. PERSPECTIVAS FUTURAS: EFECTOS DE LA SOBREENEXPRESIÓN DE LA LCPT I EN EL ESTUDIO DE LA DIABETES Y LA OBESIDAD**

Los resultados mostrados en esta tesis demuestran la importancia del metabolismo de ácidos grasos en la patogénesis de la resistencia a la insulina. Asimismo, sitúan la CPT I como un enzima crucial en este proceso, puesto que tanto inhibiciones de su actividad, ya sea por razones patológicas<sup>13,14</sup> o farmacológicas<sup>26</sup>, o incrementos en su actividad como los mostrados en este estudio, ejercen un papel importante en la modulación de la sensibilidad a la insulina en músculo. La figura 1 muestra un esquema de los efectos de CPT I en la resistencia a la insulina inducida por ácidos grasos.

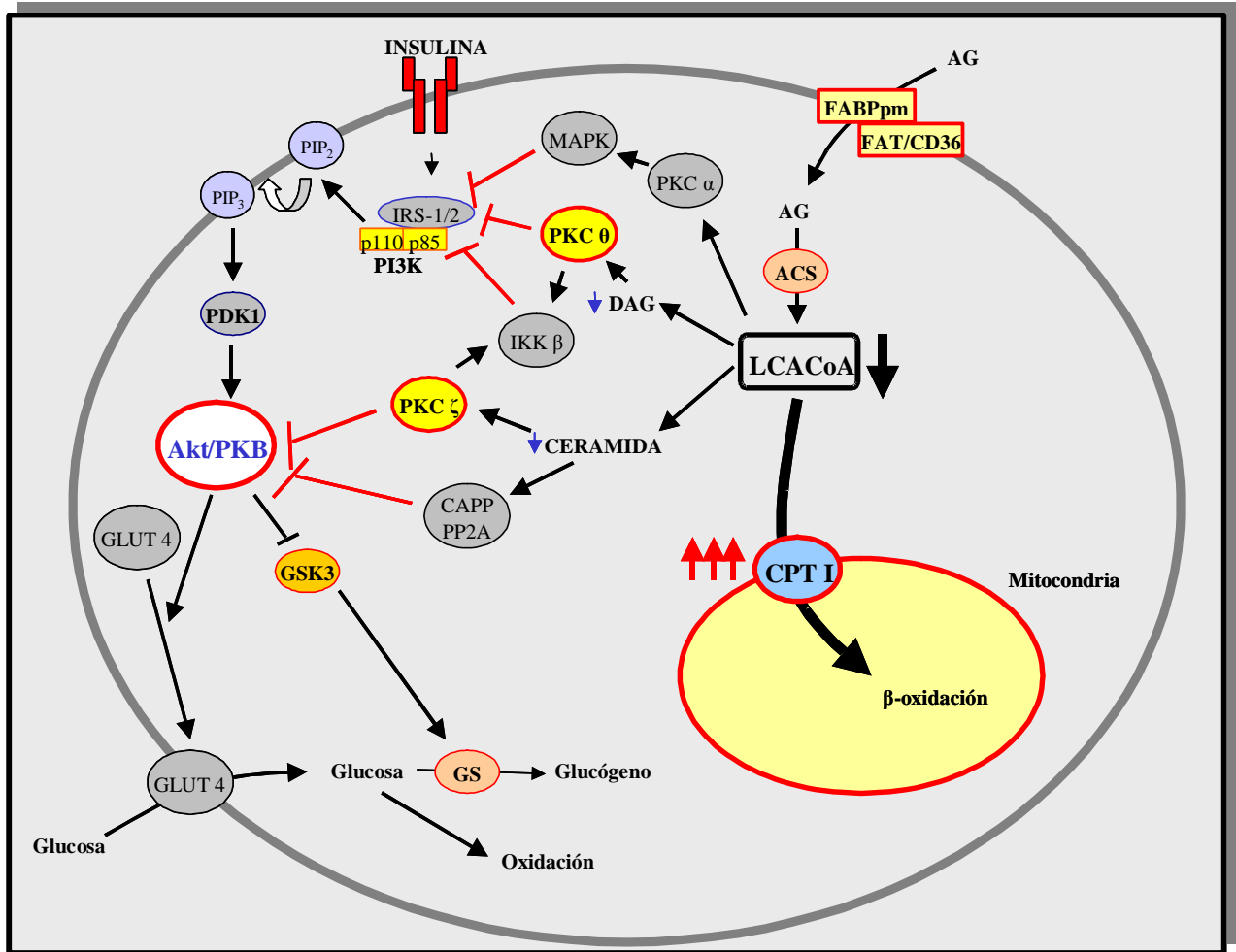
Teniendo estos resultados en cuenta, la sobreexpresión de LCPT I wt o LCPT I M593S en un sistema donde la oxidación de ácidos grasos estuviera disminuída (diabetes de tipo 2) o hubiera un aporte excesivo de lípidos (obesidad) impediría la acumulación de especies derivadas de lípidos y por lo tanto la resistencia a la insulina en músculo. Relacionado con esta hipótesis, un estudio reciente ha mostrado que la sobreexpresión hepática mediante adenovirus de la malonil-CoA descarboxilasa (MCD), la enzima que degrada el malonil-CoA, en ratas alimentadas con dieta grasa, mejora la resistencia a la insulina en músculo e hígado y animal entero<sup>27</sup>. Estos cambios están asociados a una caída de los niveles de ácidos grasos circulantes sin cambio significativo en los niveles de triglicéridos musculares, y a una disminución de los niveles de  $\beta$ -hidroxibutirato intramusculares. Los autores han propuesto que la expresión hepática de MCD baja los niveles de ácidos grasos en plasma, lo cual conduce a una bajada de  $\beta$ -hidroxibutirato en músculo y a una mejora de la sensibilidad a la insulina. Además, los ratones *knock-out* para ACC2, también están protegidos contra la obesidad y la diabetes<sup>15</sup>. Por lo tanto, las enzimas involucradas en el

---

<sup>26</sup> Dobbins RL, Szczepaniak LS, Bentley B, Esser V, Myhill H, McGarry JD. Prolonged inhibition of muscle carnitine palmitoyltransferase-1 promotes intramyocellular lipid accumulation and insulin resistance in rats. *Diabetes* 201, 50:123-130

<sup>27</sup> An J, Muoio DM, Shiota M, Fujimoto Y, Cline GW, Shulman GI, Koves TR, Stevens R, Millington D, Newgard CB. Hepatic expression of malonyl-CoA decarboxylase reverses muscle, liver and whole-animal insulin resistance. *Nat Med* 2004, 10:268-274

metabolismo de ácidos grasos, como MCD, ACC y CPT I pueden ser potenciales dianas terapéuticas para el tratamiento de la obesidad y enfermedades relacionadas como la diabetes. En este sentido, un estudio paralelo a los anteriores pero llevado a cabo sobreexpresando la LCPT I M593S en hígado o directamente en músculo, conduciría a los mismos o incluso mejores resultados debido a la insensibilidad al malonil-CoA y porque, a diferencia de la MCD y ACC, la CPT I controla directamente el flujo de ácidos grasos al interior de la mitocondria para su oxidación.



**Figura 1. Papel de la CPT I en la resistencia a la insulina inducida por ácidos grasos.** La sobreexpresión de la CPT I provoca una bajada en los niveles de aciles-CoA de cadena larga (LCACoA), que repercute en una bajada de los niveles de DAG y ceramida. Esto provoca que la activación de las proteínas quinasas involucradas en la disrupción de la señalización de la insulina no tenga lugar, impidiendo que aparezca la resistencia a la insulina asociada a los ácidos grasos.

## 2. EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE FAT/CD36 EN LA OXIDACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN CÉLULAS MUSCULARES L6E9

La complejidad de la regulación de la oxidación de ácidos grasos en músculo esquelético ha originado numerosos estudios centrados en la búsqueda de algún factor independiente de la CPT I involucrado en su control. La FAT/CD36, una proteína involucrada en el transporte de ácidos grasos a través de la membrana plasmática, ha sido descrita recientemente como una posible proteína involucrada en la regulación de la oxidación de ácidos grasos en músculo esquelético<sup>7,28</sup>. Estos autores han demostrado la presencia de esta proteína en fracciones mitocondriales de músculo de rata y humano. Además han establecido que bajo una estimulación como el ejercicio, el contenido de FAT/CD36 en la mitocondria aumenta, y con ello la oxidación de ácidos grasos. Utilizando el inhibidor específico SSO, han demostrado que la inhibición de esta proteína conlleva a una disminución de la oxidación de ácidos grasos cuando el producto de la CPT I, la acil-carnitina, es el sustrato, sin alterar la actividad de la CPT I. En base a estos resultados, estos autores han propuesto que FAT/CD36 podría actuar como una proteína transportadora de acil-carnitina desde CPT I hasta CACT. La necesidad de una proteína que desempeñase esta función ya había sido descrita anteriormente en otros estudios<sup>29</sup>. En estos estudios se proponían dos candidatos: las porinas mitocondriales y otra proteína desconocida cuyo peso molecular era equivalente al de FAT/CD36. Todas estas evidencias sugieren que esta proteína podría desempeñar un importante papel en la regulación de la oxidación de ácidos grasos en músculo esquelético.

Se ha observado que a pesar de poder aumentar la actividad CPT I, enzima clave en el transporte de ácidos grasos a la mitocondria, hasta 20 veces, la oxidación de palmitato no aumenta más de 2-2,5 veces. Estos resultados sugieren que a parte de la CPT I debe haber otro factor regulando la oxidación de ácidos grasos y teniendo en cuenta los recientes descubrimientos sobre la función de FAT/CD36 en la oxidación de ácidos grasos, adquiere importancia estudiar en las células L6E9 y en nuestras

---

<sup>28</sup> Bezaire V, Bruce CR, Heigenhauser GJF, Tandon NN, Glatz JF, Luiken JJ, Bonen A, Spriet LL. Identification of fatty acid translocase on human skeletal muscle mitochondrial membranes: essential role in fatty acid oxidation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005

<sup>29</sup> Kerner J, Hoppel C. Fatty acid import into mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 2000, 1486:1-17

condiciones experimentales, el papel de la FAT/CD36 en el control de la  $\beta$ -oxidación mitocondrial. Para ello se decidió sobreexpresar mediante el uso de adenovirus el cDNA de la FAT/CD36 de rata.

## 2.1. CARACTERIZACIÓN DEL MODELO DE ESTUDIO

La sobreexpresión de FAT/CD36 mediante adenovirus no se mostró tan efectiva como la sobreexpresión de CPT I. El máximo incremento en los niveles de proteína fue de 2 veces. Esto puede ser debido a un efecto de saturación de la proteína sobreexpresada, que posiblemente exceda su capacidad física de colocarse en su lugar en la membrana plasmática o mitocondrial en estas células, o debido al método utilizado para sobreexpresar la proteína. En otros estudios donde se ha aumentado la expresión de FAT/CD36 mediante el uso de células estables<sup>30</sup> se han alcanzado incrementos de expresión de 5 veces. Esto indica que la célula puede albergar incrementos mayores a los observados en este estudio en la expresión de FAT. En otro estudio donde se han utilizado adenovirus para sobreexpresar FAT/CD36 en células de músculo humano<sup>31</sup>, los niveles de expresión se cuantificaron a nivel de mRNA, con lo cual no es posible hacer paralelismos con nuestro estudio.

El incremento en la cantidad de proteína no fue acompañado de un incremento en el transporte de ácidos grasos en estas células. El transporte de palmitato se determinó durante 2 minutos para evitar la metabolización del palmitato una vez dentro de la célula. Quizás los niveles de sobreexpresión logrados en este estudio no sean suficientes para ver diferencias significativas bajo estas condiciones experimentales. En un estudio llevado a cabo en células C2C12 que sobreexpresan de forma estable la FAT/CD36<sup>30</sup> el transporte de palmitato aumenta 2 veces tras un incremento de 5 veces en los niveles de proteína, indicando una desproporcionalidad entre el incremento en los niveles de proteína y su función. Esto podría explicar por qué tras un incremento de 2 veces en los niveles de proteína no se aprecia ningún efecto en la captación de palmitato.

---

<sup>30</sup> Bastie CC, Hajri G, Drover VA, Grimaldi PA, Abumrad NA. CD36 channels fatty acids to a lipase-accessible triglyceride pool that is related to cell lipid and insulin responsiveness. *Diabetes* 2004, 53:2209-2216

<sup>31</sup> García-Martínez C, Marotta M, Moore-Carrasco R, Guitart M, Camps M, Busquets S, Montell E, Gómez-Foix AM. 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-C1272, 2005



Sin embargo, otra posibilidad es que la proteína sobreexpresada no sea funcional. Esta posibilidad se ha descartado puesto que la sobreexpresión de FAT/CD36 aumentó la incorporación de palmitato a lípidos intracelulares, indicando que la proteína sobreexpresada es funcional y provoca un aumento en la entrada de palmitato a la célula, donde será incorporado a los lípidos intracelulares. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por otros autores<sup>30,31</sup> en los que se describen aumentos similares en la incorporación de ácidos grasos a lípidos tras una sobreexpresión de FAT/CD36. Estos resultados confirman la funcionalidad de la proteína y sugieren que se coloca en la membrana plasmática donde aumenta la entrada de ácidos grasos y esto hace que se incorporen más a los lípidos celulares. Esto concuerda con el principal papel de esta proteína como transportadora de ácidos grasos.

## **2.2. EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE FAT/CD36 EN LA OXIDACIÓN DE PALMITATO EN CÉLULAS L6E9**

La oxidación de palmitato aumentó ligeramente tras la sobreexpresión de FAT/CD36. Este aumento en la oxidación concuerda con el observado por otros autores<sup>30,32</sup> en células C2C12 donde la expresión de FAT/CD36 estaba incrementada, aunque en estos casos el aumento en la oxidación de palmitato era mayor que en este estudio, probablemente debido a los mayores niveles de sobreexpresión alcanzados. Estos resultados indican que la sobreexpresión de FAT/CD36 aumenta la utilización de los ácidos grasos, ya sea para su incorporación a lípidos como para su oxidación. Este efecto se ha observado también *in vivo*. Así, su sobreexpresión en ratón provoca una reducción de los niveles plasmáticos de ácidos grasos y incrementa la oxidación de palmitato en músculo en contracción<sup>33</sup>.

El aumento en la oxidación de palmitato provocado por la sobreexpresión de FAT/CD36 puede deberse a dos factores: a un aumento en la entrada de palmitato en la célula y por lo tanto a una disponibilidad de sustrato elevada para la oxidación, o a un aumento del transporte dentro de la mitocondria (si esta proteína juega un papel

---

<sup>32</sup> Bastie CC, Nahlé Z, McLoughlin T, Esser K, Zhang W, Unterman T, Abumrad NA. FoxO1 stimulates fatty acid uptake and oxidation in muscle cells through CD36-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem* 2005, 380:14222-14229

<sup>33</sup> Ibrahimi A, Bonen A, Blinn WD, Hajri T, Li X, Zhong K, Cameron R, Abumrad NA. Muscle-specific overexpression of FAT/CD36 enhances fatty acid oxidation by contracting muscle, reduces plasma triglycerides and fatty acids, and increases plasma glucose and insulin. *J Biol Chem* 1999, 274:26761-26766

importante ayudando a la CPT I). Para discernir entre las dos posibilidades y comprobar si el papel mitocondrial de la FAT/CD36 podría ser el causante de la saturación del incremento en la oxidación de palmitato observado a pesar de los grandes incrementos en la actividad CPT I, se decidió co-sobreexpresar ambas proteínas en células L6E9.

La co-sobreexpresión de FAT/CD36 y LCPT I provocó un aumento en la oxidación de palmitato mayor que el provocado por la sobreexpresión de ambas proteínas por separado, sin embargo, la diferencia entre el incremento de oxidación provocado por la co-sobreexpresión de ambas proteínas respecto a la sobreexpresión de LCPT I wt solo, fue igual que el incremento en la oxidación provocado por la sobreexpresión de FAT/CD36 respecto las células control. Esto indica, que la FAT/CD36 contribuye de la misma manera al aumento en la oxidación de ácidos grasos tanto en células control como en células que sobreexpresan LCPT I. Si FAT/CD36 fuera limitante en los aumentos de oxidación provocados por CPT I, la sobreexpresión de esta proteína en células que también sobreexpresan CPT I debería haber producido un efecto sinérgico. Esta falta de efecto sinérgico, sugiere que el papel mitocondrial de FAT/CD36 no es predominante en estas células o en estas condiciones, y que el aumento de la oxidación de palmitato es debido principalmente a una mayor entrada de sustrato para la oxidación.

Sin embargo, de estos resultados no puede excluirse el posible papel mitocondrial de FAT/CD36. Quizás esta función mitocondrial sea importante bajo ciertas condiciones fisiológicas, o tras alguna estimulación como el ejercicio o la contracción muscular, como la observada en ratones transgénicos que sobreexpresan FAT/CD36 en músculo y presentan una oxidación de ácidos grasos incrementada en músculo en contracción<sup>33</sup>. De hecho, se ha demostrado que la proteína se transloca desde compartimientos intracelulares a la membrana plasmática y mitocondrias en respuesta a la contracción muscular<sup>34</sup> e insulina<sup>35</sup>. Esto sugiere que el papel de FAT/CD36 puede ser relevante bajo ciertas circunstancias donde la oxidación de ácidos grasos sea importante (por ejemplo durante el ejercicio).

En conclusión, los resultados presentados en esta tesis no permiten afirmar que FAT/CD36 esté limitando la oxidación de ácidos grasos en células L6E9, sin embargo,

---

<sup>34</sup> Bonen A, Luiken JJ, Arumugam Y, Glatz JF, Tandon NN. Acute regulation of fatty acid uptake involves the cellular redistribution of fatty acid translocase. *J Biol Chem* 2000, 275:14501-14508

<sup>35</sup> Luiken JJ, Dyck DJ, Han XX, Tandon NN, Arumugam Y, Glatz JF, Bonen A. Insulin induces the translocation of the fatty acid transporter FAT/CD36 to the plasma membrane. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002, 282:E491-E495

para establecer el papel exacto de FAT/CD36 en estas células son necesarios más experimentos, como localizar por Western blot la proteína sobreexpresada en la mitocondria o estudiar bajo qué condiciones la participación de esta proteína podría ser más importante (por ejemplo estimulación por insulina, AICAR, ejercicio...).

### 3. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE EL C75 Y LA CPT I EN CÉLULAS DE MÚSCULO ESQUELÉTICO

El C75, inhibidor de la ácido graso sintasa (FAS), se ha descrito como el primer agonista farmacológico de CPT I<sup>36</sup>, identificando la CPT I como una diana terapéutica para la obesidad y la diabetes de tipo 2. Los autores de este estudio, explican la profunda pérdida de peso a nivel periférico de los ratones tratados con C75 como una estimulación de la actividad CPT I y un incremento en la oxidación de ácidos grasos. Cuando la FAS es inhibida por el C75, los niveles elevados de malonil-CoA deberían inhibir la CPT I, sin embargo, paradójicamente, en los tejidos periféricos el C75 estimula la actividad CPT I a pesar de estos niveles aumentados de malonil-CoA. Por otro lado se ha descrito que la cerulenina, un inhibidor natural de la FAS, inhibe la actividad CPT I<sup>37,38</sup> *in vivo* e *in vitro*, acompañado por una reducción de la oxidación de ácidos grasos.

Teniendo en cuenta estas acciones paradójicas del C75 y el hecho que el uso del C75 podría tener los mismos efectos que la sobreexpresión de la LCPT I en músculo esquelético, decidimos estudiar el efecto del C75 en la actividad CPT I en las células L6E9. En las células musculares los niveles de expresión de FAS son muy bajos, debido a que el músculo no es un tejido lipogénico<sup>39</sup>, permitiéndonos estudiar de manera más directa la interacción entre el C75 y la CPT I.

---

<sup>36</sup> Thupari JN, Landree LE, Ronnet GV, Kuhajda FP. C75 increases peripheral energy utilization and fatty acid oxidation in diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99:9498-9502

<sup>37</sup> Thupari JN, Pinn ML, Kuhajda FP. Fatty acid synthase inhibition in human breast cancer cells leads to malonyl-CoA-induced inhibition of fatty acid oxidation and cytotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 2001, 285:217-223

<sup>38</sup> Jin YJ, Li SZ, Zhao ZS, An JJ, Kim RY, Baik JH, Lim SK. Carnitine palmitoyltransferase I (CPT I) activity stimulation by cerulenin via sympathetic nervous system overrides cerulenin's peripheral effect. *Endocrinology* 2004, 145: 3197-3204

<sup>39</sup> Hamilton C, Saggerson ED. Malonyl-CoA metabolism in cardiac myocytes. *Biochem J* 2000, 350:61-67

### 3.1. EL C75 INHIBE LA ACTIVIDAD CPT I EN CÉLULAS DE MÚSCULO ESQUELÉTICO

Estudios recientes llevados a cabo en nuestro grupo han demostrado que el C75 tiene un pequeño efecto activador sobre LCPT I o MCPT I sobreexpresadas en levadura, observándose sólo un 15% de activación<sup>40</sup>. En cambio, al igual que ocurre con el etomoxir, un inhibidor irreversible de la CPT I, que necesita ser transformado a etomoxiril-CoA para ser activo<sup>41</sup>, se ha demostrado por MALDI-TOF que el C75 se transforma también a C75-CoA. Sólo cuando ambos compuestos se transforman a sus derivados CoA muestran sus efectos sobre MCPT I y LCPT I expresadas en levadura. En el caso de las células L6E9, fracciones enriquecidas en mitocondrias se incubaron con C75-CoA, en cambio las células se incubaron directamente con C75, ya que la activación a C75-CoA ocurrirá posiblemente en el citoplasma gracias a la acción de las acil-CoA sintetasas intracelulares.

En las células L6E9, sorprendentemente, el C75 no sólo no activa la CPT I, sino que la inhibe. Esto se ha comprobado tanto incubando las fracciones enriquecidas en mitocondrias con cantidades crecientes de C75-CoA como incubando las células directamente con C75 y realizando el ensayo de actividad en fracciones enriquecidas en mitocondrias. Esta inhibición se vio también en células  $\beta$  de páncreas INS(832/13) y células HEK 293<sup>40</sup>.

Es interesante comparar estos resultados donde el C75 inhibe la actividad CPT I con los obtenidos por otros investigadores<sup>36,42</sup> que han observado una activación de la CPT I. En el estudio de Yang y colaboradores<sup>42</sup>, la actividad CPT I aumentaba tras la incubación de células de hepatocarcinoma humano (HepG2) con C75, y en el estudio de Thupari y colaboradores<sup>36</sup> la actividad CPT I aumentaba en células de cáncer de mama humano (MCF-7), en adipocitos de ratón (3T3L-1) y en hepatocitos primarios. Las discrepancias entre estos resultados y los obtenidos en este estudio podrían explicarse

---

<sup>40</sup> Bentebibel A, Sebastián D, Herrero L, Lopez-Viñas E, Serra D, Asins G, Gomez-Puertas P, Hegardt FG. A novel effect of C75 on carnitine palmitoyltransferase I and palmitate oxidation. *Biochemistry* 2006. (In press)

<sup>41</sup> Weis BC, Cowan AT, Brown N, Foster DW, McGarry JD. Use of a selective inhibitor of liver carnitine palmitoyltransferase I (CPT I) allows quantification of its contribution to total CPT I activity in rat heart. Evidence that the dominant cardiac CPT I isoform is identical to the skeletal muscle enzyme. *J. Biol. Chem.* 269:26446-26448, 1994

<sup>42</sup> Yang N, Krays JS, Skillman TR, Burris L, Seng TW, Hammond C. C75 activates carnitine palmitoyltransferase I in isolated mitochondria and intact cells without displacement of bound malonyl-CoA. *J Pharmacol Exp Ther* 2005, 312:127-133

por la diferente metodología utilizada para medir la actividad CPT I. En los estudios de Yang y Thupari, la actividad CPT I se midió en células permeabilizadas con digitonina, mientras que en este estudio se ha ensayado la actividad CPT I en fracciones enriquecidas en mitocondrias. Es posible que la permeabilización con digitonina junto con el tratamiento con C75 pueda alterar las interacciones entre la mitocondria y el citoesqueleto<sup>43</sup> que pueden alterar la actividad CPT I o interferir en el ensayo. Se ha sugerido que cambios en la composición lipídica del microentorno de la membrana donde reside la CPT I pueden modular la actividad CPT I<sup>44,45,46,47,48</sup>, indicando la importancia de estas interacciones con la membrana mitocondrial para su actividad y regulación. Numerosas aproximaciones<sup>6,48,49,50,51</sup> sugieren que la modulación de las interacciones entre los dominios de la CPT I, por ejemplo por modificación covalente (fosforilación)<sup>52</sup> de la proteína, pueden estar también involucradas en la actividad de la

<sup>43</sup> Guzmán M, Velasco G, Geelen MJH. Do cytoskeletal components control fatty acid translocation into liver mitochondria? *Trend Endocrinol Metab* 2000, 11:49-53

<sup>44</sup> Zammit VA, Corstrophine CG, Kolodziej MP, Fraser F. Lipid molecular order in liver mitochondrial outer membranes, and sensitivity of carnitine palmitoyltransferase I to malonyl-CoA. *Lipids* 1998, 33:371-376

<sup>45</sup> Mynatt RL, Greenhaw JJ, Cook GA. Cholate extracts of mitochondrial outer membranes increase inhibition by malonyl-CoA of carnitine palmitoyltransferase I by a mechanism involving phospholipids. *Biochem J* 1994, 299:761-767

<sup>46</sup> Zammit VA. Carnitine acyltransferases: functional significance of subcellular distribution and membrane topology. *Prog Lipid Res* 1999, 38:199-224

<sup>47</sup> Fraser F, Padovese R, Zammit VA. Distinct kinetics of carnitine palmitoyltransferase in contact sites and outer membranes of rat liver mitochondria. *J Biol Chem* 2001, 276:20182-20185

<sup>48</sup> Swanson ST, Foster DW, McGarry JD, Brown NF. Roles of the N and C-terminal domains of carnitine palmitoyltransferase I isoforms in malonyl-CoA sensitivity of the enzymes: insights from expression of chimaeric proteins and mutation of conserved histidine residues. *Biochem J* 1998, 335:513-519

<sup>49</sup> Jackson VN, Zammit VA, Price NT. Identification of positive and negative determinants of malonyl-CoA sensitivity and carnitine affinity within the amino termini of rat liver- and muscle-type carnitine palmitoyltransferase I. *J Biol Chem* 2000, 275:38410-38416

<sup>50</sup> Jackson VN, Price NT, Zammit VA. Specificity of the interactions between Glu-3, Ser-24, and Gln-30 within the N-terminal segment of rat liver mitochondrial overt carnitine palmitoyltransferase (L-CPT I) in determining the malonyl-CoA sensitivity of the enzyme. *Biochemistry* 2001, 40:14629-14634

<sup>51</sup> Shi J, Zhu H, Arvidson DN, Cregg JM, Woldergiorgis G. Deletion of the conserved first 18 N-terminal amino acid residues in rat liver carnitine palmitoyltransferase I abolishes malonyl-CoA sensitivity and binding. *Biochemistry* 1998, 37:11033-11038

<sup>52</sup> Kerner J, Distler AM, Minkler PE, Parland W, Peterman SM, Hoppel CL. Phosphorilation of rat liver mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I (CPT I): Effect on the kinetic properties of the enzyme. *J Biol Chem* 2004, 279:41104-41113

CPT I. Estos sucesos pueden ocurrir como consecuencia de una acción indirecta del C75 en células permeabilizadas.

### 3.2. EL C75 INHIBE LA OXIDACIÓN DE PALMITATO EN CÉLULAS L6E9

Los experimentos realizados en este estudio demuestran que el C75 inhibe la oxidación de palmitato en células L6E9, en concordancia con la inhibición de la actividad CPT I observada. Esta inhibición se vio también en células HEK-293 y en células INS(832/13)<sup>40</sup>. Estos resultados discrepan con aquellos obtenidos por otros<sup>36,53</sup> realizados en hepatocitos primarios, adipocitos de ratón y neuronas corticales, donde se ha encontrado una activación de la oxidación de palmitato. Sin embargo, en islotes de páncreas de rata la cerulenina provoca una ligera disminución de la oxidación de palmitato<sup>54</sup>. Es difícil explicar estas discrepancias, que pueden ser debidas a diferencias a la línea celular usada, a las condiciones experimentales o a otras vías de señalización celulares.

Recientemente ha sido descrito que en ratas, la inhibición de la actividad CPT I en el hipotálamo causa una reducción en la ingesta de comida y la producción de energía<sup>55</sup>, sugiriendo que el incremento en los aciles-CoA de cadena larga debido a la inhibición de la CPT I representa una señal central de abundancia de nutrientes. Además, la administración central del ácido graso de cadena larga ácido oleico también inhibe la ingesta de comida y la producción de glucosa<sup>56</sup>. Estos hallazgos apoyan la idea que los niveles aumentados de aciles-CoA de cadena larga funcionan como un sensor de disponibilidad de nutrientes en las neuronas hipotalámicas. Finalmente, los endocannabinoides, que tienen un potente efecto orexigénico (estimulador del apetito), estimulan la actividad CPT I y la oxidación de ácidos grasos en astrocitos en cultivo independientemente del malonil-CoA y a través de la interacción con los receptores

---

<sup>53</sup> Landree LE, Hanlon AL, Strong DW, Rumbaugh G, Miller IM, Thupari JN, Connolly EC, Hunganir RL, Richardson C, Witters LA, Kuhajda FP, Ronnet GV. C75, a fatty acid synthase inhibitor, modulates AMP-activated protein kinase to alter neuronal energy metabolism. *J Biol Chem* 2004, 279:3817-3827

<sup>54</sup> Yayima H, Komatsu M, Yamada S, Straub SG, Kaneko T, Sato Y, Yamauchi K, Hashizume K, Sharp GWG, Aizawa T. Cerulenin, an inhibitor of protein acylation, selectively attenuates nutrient stimulation of insulin release. *Diabetes* 2000, 49:712-717

<sup>55</sup> Obici S, Feng Z, Arduini A, Conti R, Rossetti L. Inhibition of hypothalamic carnitine palmitoyltransferase 1 decreases food intake and glucose production. *Nat Med* 2003, 9:756-761

<sup>56</sup> Obici S, Feng Z, Morgan K, Stein D, Karkanias G, Rossetti L. Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake. *Diabetes* 2002, 51:271-275

CB<sub>1</sub><sup>57,58</sup>. En conjunto, estos estudios apoyan la evidencia a favor de la implicación de la inhibición de la CPT I en la disminución de la ingesta. De este modo, los efectos del C75 sobre la reducción de la ingesta podrían cursar a través de la inhibición de la CPT I.

Sin embargo, esto no explica el incremento en el gasto de energía y la profunda pérdida de peso observados en tejidos periféricos en ratón. Una posible explicación de este aumento en el gasto energético podría ser la estimulación de la expresión de UCP-3 en músculo esquelético tras un tratamiento a largo plazo con C75, sugiriendo que este aumento en la expresión de UCP-3 podría aumentar la termogénesis y explicar por tanto el incremento en el gasto de energía<sup>59</sup>. Además, recientemente se ha observado que la sobreexpresión de UCP-3 en músculo esquelético provoca un aumento en la oxidación de ácidos grasos<sup>60</sup>, sugiriendo esto que el aumento en el gasto de energía podría deberse a un incremento en la oxidación de ácidos grasos debida a una mayor expresión de UCP-3 mediada por el C75.

El C75 fue diseñado como agente antitumoral, debido a sus propiedades proapoptóticas<sup>61</sup>. Para excluir la posibilidad que la inhibición de la oxidación de palmitato causada por el C75 fuera debida al efecto citotóxico de éste, se llevaron a cabo experimentos de viabilidad celular. Estos experimentos confirmaron que la viabilidad celular no se veía afectada en las condiciones utilizadas en este estudio. La sensibilidad de la célula a los efectos citotóxicos del C75 depende de la composición y metabolismo lipídicos. Por ejemplo, la línea celular de carcinoma de mama SKBR3, que tiene un alto contenido en lípidos, necesita 6 horas de preincubación con C75 para presentar efectos citotóxicos<sup>61</sup>. Sin embargo en células L6E9, donde la expresión de

---

<sup>57</sup> Blázquez C, Sánchez C, Daza A, Galve-Roperh I, Guzmán M. The stimulation of ketogenesis by cannabinoids in cultured astrocytes defines carnitine palmitoyltransferase I as a new ceramide-activated enzyme. *J Neurochem* 1999, 72:1759-1768

<sup>58</sup> Di Marzo V, Goparaju SK, Wang L, Liu J, Batkai S, Jarai Z, Fezza F, Miura GI, Palmiter RD, Sugiura T, Kunos G. Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature* 2001, 410:822-825

<sup>59</sup> Cha SH, Hu Z, Lane MD. Long-term effects of a fatty acid synthase inhibitor on obese mice: food intake, hypothalamic neuropeptides, and UCP3. *BBRC* 2004, 317:301-308

<sup>60</sup> McLellan JD, Gerrits MF, Gowing A, Smith PJS, Wheeler MB, Harper ME. Physiological increases in uncoupling protein 3 augment fatty acid oxidation and decrease reactive oxygen species production without uncoupling respiration in muscle cells. *Diabetes* 2005, 54:2343-2350

<sup>61</sup> Pizer ES, Thupari J, Han WF, Pinn ML, Chrest FJ, Frehywot GL, Townsend CA, Kuhajda FP. Malonyl-CoA is a potential mediator of cytotoxicity induced by fatty acid synthase inhibition in human breast cancer cells and xenografts. *Cancer Res* 2000, 60:213-218

FAS por lo tanto la biosíntesis de lípidos son bajas, más de 3 horas de preincubación con C75 provocan un efecto citotóxico.

### 3.3. EL C75 INHIBE LA CPT I EN MÚSCULO *IN VIVO* A CORTO PLAZO

Los experimentos realizados sobre células en cultivo que demuestran que el C75 inhibe la actividad CPT I y la oxidación de palmitato han sido corroborados por experimentos llevados a cabo *in vivo* en ratón. La inyección intraperitoneal de C75 en ratón provoca una inhibición de la actividad CPT I en músculo a periodos de tiempo cortos (30 min), recuperándose hasta niveles control a periodos más largos. En estudios realizados en nuestro grupo se ha observado que esta inhibición se da también en hígado y páncreas<sup>40</sup>, aunque el porcentaje de inhibición y el tiempo necesario para llegar a los máximos efectos varían según el tejido. Esto puede ser debido a la velocidad de activación del C75 a C75-CoA en cada tejido, así como a su farmacocinética.

La cerulenina, el compuesto natural en base a cual se ha sintetizado el C75, provoca una reducción de la actividad CPT I<sup>37,62</sup>. En el primer caso<sup>37</sup>, la disminución de la actividad CPT I se ha correlacionado con una reducción de la oxidación de ácidos grasos y un incremento en la citotoxicidad en células de cáncer de mama humano tratadas con cerulenina. En el segundo caso<sup>62</sup>, se ha demostrado que el tratamiento de ratones con cerulenina tiene un efecto dual en hígado y músculo, con una inhibición de la actividad CPT I en primer lugar seguida por una estimulación, probablemente mediada por una activación del sistema nervioso simpático. El C75 puede tener un mecanismo de acción semejante, produciendo un efecto dual en la actividad CPT I: una inhibición seguida de una activación. Esto estaría de acuerdo con el mayor gasto energético observado en ratones tratados con C75 durante varias horas.

La inhibición de la actividad CPT I tras el tratamiento a corto plazo con C75 concuerda con los estudios llevados a cabo por Clegg y colaboradores<sup>63</sup>. En estos estudios se ha observado una inhibición del gasto energético tras la inyección intraperitoneal de C75 en ratas después de 16 horas. Además, recientemente ha sido descrito que la inyección intracerebroventricular de C75 causa un aumento de la

---

<sup>62</sup> Jin YJ, Li SZ, Zhao ZS, An JJ, Kim RY, Baik JH, Lim SK. Carnitine palmitoyltransferase I (CPT I) activity stimulation by cerulenin via sympathetic nervous system overrides cerulenin's peripheral effect. *Endocrinology* 2004, 145: 3197-3204

<sup>63</sup> Clegg, D.J, Wortman, M.D., Benoit, S.C., McOsker, C.C., and Seeley, R.J. Comparison of central and peripheral administration of C75 on food intake, body weight, and conditioned taste aversion, *Diabetes* 2002, 51: 196-201.



oxidación de palmitato en músculo mediada por el sistema nervioso simpático<sup>64</sup>. Así, la recuperación en la actividad CPT I observada en músculo en este estudio puede deberse a un efecto del C75 sobre el sistema nervioso.

En conclusión, los resultados presentados en esta tesis demuestran que el C75-CoA es un potente inhibidor de la CPT I en músculo esquelético tanto en células en cultivo como *in vivo* en músculo de ratón.

---

<sup>64</sup> Cha, SH., Hu, Z., Chohnan, S., Lane, MD. Inhibition of hypothalamic fatty acid synthase triggers rapid activation of fatty acid oxidation in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, 102:14557-62.



## **CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

1. La sobreexpresión de LCPT I wt de rata y LCPT I M593S en células L6E9 incrementa los niveles de proteína y la actividad enzimática de la CPT I de forma proporcional sin observarse saturación con las cantidad de virus utilizadas.
2. La actividad CPT I en células L6E9 que sobreexpresan LCPT I M593S no se inhibe por malonil-CoA.
3. La sobreexpresión de LCPT I wt o LCPT I M593S aumenta la oxidación de palmitato en células L6E9, llegándose a una saturación a partir de un incremento de tres veces en la actividad CPT I.
4. Al aumentar la concentración de glucosa la oxidación de palmitato disminuye, pero en las células que sobreexpresan LCPT I wt y LCPT I M593S la oxidación de palmitato se mantiene más elevada que en las células control. Las células que sobreexpresan LCPT I M593S presentan un mayor incremento en la oxidación de palmitato respecto a las células que sobreexpresan LCPT wt sólo a altas concentraciones de glucosa.
5. La incorporación de ácidos grasos a lípidos intracelulares está disminuída en células L6E9 que sobreexpresan LCPT I respecto a células control, viéndose diferencias significativas en la incorporación de ácidos grasos a triglicéridos entre las células que sobreexpresan LCPT I wt y LCPT I M593S.
6. Los niveles celulares de DAG y ceramida aumentan de forma significativa en células L6E9 tratadas con palmitato. En aquellas células que sobreexpresan LCPT I wt y LCPT I M593S este aumento está bloqueado.
7. El palmitato bloquea el aumento en la captación de glucosa y síntesis de glucógeno estimulados por insulina en células L6E9. La sobreexpresión de LCPTI wt y LCPT I M593S restaura ambos tras la incubación con palmitato.

**8.** La incubación de células L6E9 con palmitato produce un incremento en las actividades PKC  $\theta$  y PKC  $\zeta$  que es contrarrestada con la sobreexpresión de LCPTI wt y LCPT I M593S.

**9.** La sobreexpresión de LCPTI wt y LCPT I M593S provoca una recuperación parcial de la actividad Akt PKB/ estimulada por insulina en células L6E9 incubadas con palmitato.

**10.** La sobreexpresión de FAT/CD36 de rata en células L6E9 provoca un aumento en la incorporación de palmitato a lípidos celulares, consistente con el papel de la proteína como transportadora de ácidos grasos.

**11.** La sobreexpresión de FAT/CD36 en células L6E9 provoca un aumento en la oxidación de palmitato. La co-sobreexpresión de FAT/CD36 y LCPT I wt aumenta la oxidación de palmitato en mayor proporción que cuando ambas proteínas se sobreexpresan por separado, sin embargo no se aprecia efecto sinérgico, indicando que la FAT/CD36 no es un factor limitante en la saturación del incremento en la oxidación de palmitato provocado por la sobreexpresión de LCPT I.

**12.** El C75 inhibe la actividad CPT I en células L6E9. Esta inhibición se correlaciona con una inhibición de la oxidación de palmitato, mientras la viabilidad celular no se ve afectada.

**13.** La inyección intraperitoneal de C75 en ratón provoca una inhibición a corto plazo de la actividad CPT I en mitocondrias de músculo, recuperándose posteriormente.

**PUBLICACIONES**