

Efecte de l'activació de PPAR β/δ sobre l'oxidació d'àcids grassos i el procés inflamatori

Emma Barroso Fernández

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

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

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Universitat de Barcelona

Facultat de Farmàcia

Departament de Farmacologia i Química Terapèutica

Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia

Efecte de l'activació de PPAR β/δ sobre l'oxidació d'àcids grassos i el procés inflamatori

Emma Barroso Fernández

2011



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Universitat de Barcelona

Facultat de Farmàcia

Departament de Farmacologia i Química Terapèutica

PROGRAMA DE DOCTORAT: RECERCA, DESENVOLUPAMENT I CONTROL DE
MEDICAMENTS

Efecte de l'activació de PPAR β/δ sobre l'oxidació d'àcids grassos i el procés inflamatori

Memòria presentada per

Emma Barroso Fernández

per optar al títol de doctor per la Universitat de Barcelona

El Director,

La doctoranda,

Dr. Manuel Vázquez-Carrera

Emma Barroso Fernández

Aquest treball ha estat realitzat al Departament de Farmacologia i Química Terapèutica de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona, essent finançat per:

Ministerio de Ciencia e Innovación

(Projecte SAF 2006-01475 i SAF 2009-06939)

**Centro de Investigación Biomédica en Red Diabetes y Enfermedades
Metabólicas Asociadas**

ciberdem

AGRAÏMENTS

A punto de llevar esta tesis a encuadernar me siento delante del ordenador sin saber muy bien que escribir. Llevo rehuyendo este momento desde hace días, y no es porque crea que no tenga nada que agradecer ¡ni mucho menos!, ni que ya me haya olvidado de todas las personas que me han ayudado y han estado ahí cuando más lo necesitaba durante estos años de trabajo, faltaría más. Es sólo que... eso de expresar mis sentimientos, y más por escrito, nunca ha sido lo mío... creo que viene de familia... En fin, sólo espero que todas las personas a las que aprecio lo sepan, y que aunque no sepa demostrarlo por escrito, espero habérselo demostrado en el día a día.

En primer lloc el més gran agraïment al Dr. Vázquez-Carrera per donar-me l'oportunitat de treballar en el seu equip d'investigació. Gràcies per la confiança dipositada en mí i tot l'ajut rebut.

En segon lloc moltes gràcies al Ricardo (per ser més correcta al Dr. Rodríguez-Calvo). Per la teva confiança des del primer dia i els teus consells. I sobretot per animar-me a tirar endavant.

I moltíssimes gràcies a tots el companys de laboratori. A tots els que esteu ara i tots els que han estat. De tots vosaltres (sí, de tots sense excepcions) he après coses noves que m'han ajudat a madurar en la feina i sobretot com a persona.

No volia nombrar gent per por d'oblidar-me algú i per que no es fes molt pesat, però crec que hi ha noms que no puc deixar de dir, sense desmerèixer a ningú. Moltes gràcies a les meves companyes i amigues, Lucía i Alba, són les que més m'han "aguantat" durant aquest temps i no sé que hauria fet sense elles. Moltes gràcies a la Marty pels seus mails d'ànim i ser sempre tan maca. Ah!! I com no, moltes gràcies al meus "companys de Tesi" el David i el Pou. I al Pizarro, també company d'esmorzar, pels seus consells sobre la tesi.

Com no, moltes gràcies als meus pares, germanes i cunyats, que m'estimen tal com sóc. Si tot va bé aquest any serem un més a la família! Moltes gràcies també a la meva família del Prat. Tots m'heu ajudat molt.

I finalment, moltes gràcies a l'Albert, per la teva paciència amb mí, que és molta, i sobretot en els últims mesos, i per estar quan et necessito.

Muchas gracias a todos.

ABREVIATURES.....	1
PRESENTACIÓ.....	5
INTRODUCCIÓ.....	13
1. RECEPTORS ACTIVATS PER PROLIFERADORS PEROXISÒMICS.....	15
1.1 Estructura.....	16
1.2 Subtipus.....	17
1.3 Distribució tissular i lligands.....	17
1.4 Mecanismes d'acció dels PPARs.....	20
1.4.1 Trans-activació.....	20
1.4.2 Trans-repressió.....	21
1.4.3 Factors que afecten l'activitat PPAR.....	23
1.5 PPAR α	24
1.6 PPAR β/δ	27
1.7 PPAR γ	33
2. METABOLISME DELS ÀCIDS GRASSOS.....	38
2.1 Activació i transport dels àcids grassos a la matriu mitocondrial....	39
2.2 β -Oxidació.....	40
2.3 Regulació de la β -oxidació.....	43
2.3.1 AMPK.....	43
2.3.2 PGC1- α	46
2.3.3 Lipina 1.....	47
2.3.4 SIRT1.....	48
3. EL FACTOR DE TRANSCIPCIÓ PRO-INFLAMATORI NF-κB.....	51
3.1 NF- κ B.....	51
3.1.1 I κ B.....	53
3.2 Hsp27.....	54

INDEX

3.3 Regulació per acetilació/desacetilació de l'activitat NF- κ B.....	55
3.3.1 CBP/p300.....	56
3.3.2 SIRT1.....	57
OBJECTIUS.....	59
RESULTATS I DISCUSSIÓ.....	63
I. PPARβ/δ activation prevents the downregulation of AMPK, Lipin1 and PGC1-α caused by a high-fat diet in liver and amplifies the PPARα pathway leading to increased fatty acid oxidation.....	65
II. The Peroxisome Proliferator-Activated Receptorβ/δ (PPARβ/δ) Agonist GW501516 Prevents TNF-α-induced NF-κB Activation in Human HaCaT Cells by Reducing p65 Acetylation through AMPK and SIRT1.....	105
DISCUSSIÓ GLOBAL.....	121
CONCLUSIONS.....	133
BIBLIOGRAFIA.....	137
ANNEX.....	173
Review Article. The role of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor β/δ on the Inflammatory Basis of the Metabolic Disease	

ABREVIATURES

ABREVIATURES

ACC	Acetil-CoA carboxilasa
ACO	Acil-CoA oxidasa
ACS	Acil-CoA Sintetasa
ADN	Àcid desoxiribonucleic
AF-1	<i>Activation Function-1</i>
AG	Àcid gras
AICAR	5-aminoimidazol-4-carboxamida 1-β-D-ribonucleòsid
AMP	Adenosina 5'-monofosfat
AMPK	Adenosina 5'-monofosfat quinasa
AMPKK	Adenosina 5'-monofosfat quinasa quinasa
APO	Apoproteïna, Apolipoproteïna
aP2	<i>Adipose protein 2</i>
ARNm	Àcid ribonucleic missatger
ATP	Adenosina 5'-trifosfat
BCL6	<i>B cell lymphoma 6</i>
CARM	Activitat metiltransferasa
CACT	Acilcarnitina transferasa
CaMKKβ	<i>Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase β</i>
CAP	Proteïna associada a c-CBL
CBP	<i>cyclic AMP response element binding protein, [CREB]-binding protein</i>
CK	Caseïna quinasa
CPT-I	Carnitina-palmitoil-transferasa I
CREB	Element de resposta a AMPc
CTE	Tioesterasa citosòlica
DAG	Diacilglicerol
DBD	<i>DNA binding domain</i>
DR-1	<i>Direct repeat-1</i>
EH	Enoil-CoA hidratasa
ERK	<i>Extracellular signal-Related Kinase</i>
FAD	Dinucleòtid de flavina

ABREVIATURES

FADH₂	Dinucleòtid de flavina forma reduïda
FAS	<i>Fatty acid synthase</i>
FABP	Proteïna d'unió a àcids grassos
FAT	Translocasa d'àcids grassos
FAPT	Proteïna transportadora d'àcids grassos
Fld	<i>Fatty liver dystrophy</i>
FOXO	<i>Forkhead fox</i>
GLUT4	Transportador de glucosa 4
HAD	3-Hidroxiacil-CoA deshidrogenasa
HAT	Activitat acetil-transferasa d'histones
HDL	Lipoproteïna d'alta densitat
HETES	Àcids hidroxiieicosatetraenoics
HFD	<i>High fat diet</i>
HDAC	Histona desacetilasa
HMG-CoA	Hidroximetil glutarasa Co-A
Hsp	<i>Heat-shock protein</i>
HODE	Àcid 9-hidroxiocetadecadienoic
ICAM	<i>Inter-Cellular Adhesion Molecule</i>
IL	Interleucina
IFN	Interferó
IKK	Quinasa de IκB
IP-10	Proteïna induïble per l'interferó 10
IRS	Substrat del receptor d'insulina
IκB	Proteïna inhibidora κB
I-TAC	Proteïna quimiotàctica α induïble per cèl·lules T
JNK	Quinasa c-Jun NH ₂ -terminal
KDa	Quilodalton
KT	3-Cetotiolasa
LBD	<i>Ligand binding domain</i>
LCAD	<i>Long chain AD</i>
LDL	Lipoproteïna de baixa densitat
LSH	Lipasa sensible a hormones

LTB4	Leucotriè 4
LXXLL	L, leucina i X, qualsevol aminoàcid
MAPK	Proteïna quinasa activada per mitògens
MAT	Metilacetoacetil CoA tiolasa
MCAD	<i>Medium-chain acyl-coA dehydrogenase</i>
MCD	Malonil-CoA descarboxilasa
MCP	<i>Monocyte Chemotactic Protein</i>
MME	Matriu mitocondrial externa
MMI	Matriu mitocondrial interna
MO25	<i>Mouse protein 25</i>
MTP	<i>Microsomal Triglyceride Transfer Protein</i>
NAD⁺	Dinucleòtid de nicotinamida adenina
NADH	Dinucleòtid de nicotinamida adenina forma reduïda
Npc1L1	<i>Niemann-Pick C1-Like 1</i>
NLS	Seqüències de localització nuclear
NEMO	<i>NF-κB essential modifier</i>
NFAT	Factor nuclear de cèl·lules T activades
NF-κB	Factor nuclear-κB
NCoR	Receptor nuclear corepressor
PAP	<i>Phosphatidate Phosphatase</i>
PEPCK	<i>Phosphoenolpyruvate carboxykinase</i>
PGC-1	<i>PPARγ coactivator-1</i>
PKA	Proteïna quinasa A
PKC	Proteïna quinasa C
PPs	Proliferadors peroxisòmics
PP2A	Proteïna fosfatasa 2A
PPAR	Receptor activat per proliferadors peroxisòmics
PPRE	Element de resposta a proliferadors peroxisòmics
RHD	Domini d'homologia Rel
RXR	Receptors retinoids X
SCAD	<i>Short chain AD</i>

ABREVIATURES

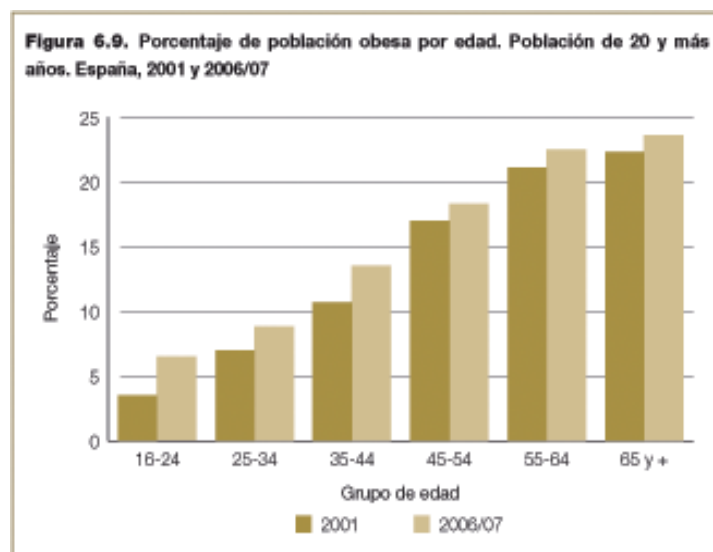
SCD1	<i>Stearoyl-CoA Desaturase-1</i>
SCOT	Succinil CoA:3-oxoacid CoA-transferasa
SIRT1	<i>Silent information regulator T1</i>
SMRT	Silenciador del receptor d'hormones retinoides i tiroïdals
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>
STRAD	<i>STE-related adapter</i>
TAK1	<i>Transforming-growth- factor activated kinase</i>
TG	Triglicèrid
TGFβ	<i>Transforming growth factor β</i>
TNF-α	Factor de necrosis tumoral- α
TSLP	<i>Thymic stromal lymphopoietin</i>
TZD	Tiazolidindiones
UCP	Proteïna desacobladora
UV	Ultraviolat
VCAM	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i>
VLCAD	<i>Very long chain AD</i>
VLDL	Lipoproteïna de molt baixa densitat

PRESENTACIÓ

El canvi en els estils de vida de les societats industrialitzades juntament amb l'augment en el consum d'aliments hipercalòrics i amb alt contingut en greixos saturats ha provocat en els últims anys un augment en la prevalença de l'obesitat, la diabetis i les malalties cardiovasculars.

A l'Estat espanyol s'ha observat que la freqüència d'obesitat augmenta amb l'edat, sent superior al 20% de la població a partir dels 55 anys (figura 1A), segons dades recollides pel *Ministerio de Sanidad y Política Social* i publicades al seu informe "*Indicadores de Salud 2009*". A més, en el mateix informe, s'estima que el consum d'energia de la població espanyola va augmentar entre els anys 1970 i 2003 en un 25%, passant de 2734 calories per persona i dia a 3421 i que el percentatge de l'ingesta calòrica en greixos va passar d'un 29% l'any 1970 a un 41,2% al 2003, fet que suposa un augment relatiu en el consum de greixos del 40% (figura 1B).

A



PRESENTACIÓ

B

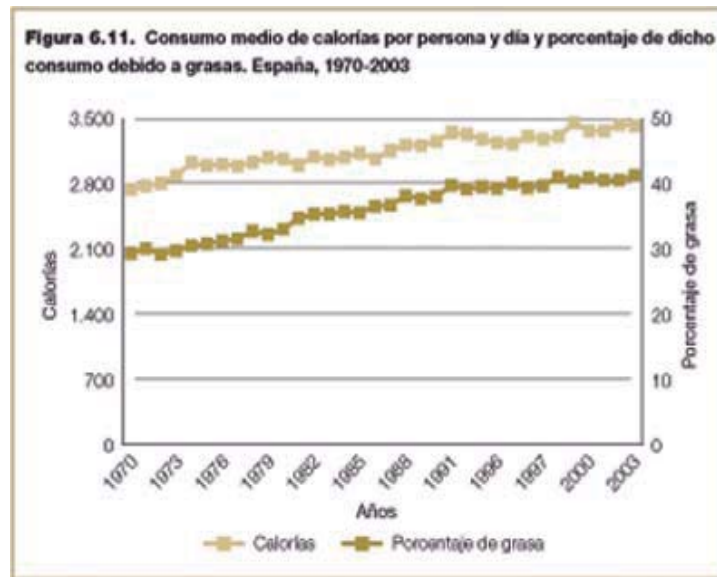


Figura 1. A. Percentatge de població obesa per edat (≥ 20 anys) a la població espanyola els anys 2001 i 2006/7. **B.** Evolució del consum mitjà de calories per persona i dia i percentatge de consum en greixos a l'Estat espanyol entre els anys 1970 i 2003.

La presència d'obesitat, especialment d'obesitat abdominal, juntament amb l'aparició de resistència a la insulina són els principals factors de risc responsables del desenvolupament del síndrome metabòlic i la diabetis mellitus de tipus 2 (Bertoni i col., 2001; Halpern i col., 2010). A més, diversos estudis han demostrat que tant el síndrome metabòlic com la diabetis mellitus de tipus 2 es relacionen amb un increment significatiu de risc de malaltia cardiovascular. Aquest fet s'explica en part per que ambdues patologies presenten en comú una dislipèmia caracteritzada per la presència d'hipertriglicèridèmia i nivells reduïts de lipoproteïnes d'alta densitat (HDL) (Ginsberg i col., 2009).

La dislipèmia associada al síndrome metabòlic i la diabetis mellitus de tipus 2, també anomenada dislipèmia aterogènica, es caracteritza inicialment per un augment de la síntesi hepàtica de triglicèrids, i en conseqüència, una major secreció de lipoproteïnes VLDL. Aquest fet provoca una sèrie de modificacions en el metabolisme de les lipoproteïnes, generant-se partícules LDL més petites i denses i una reducció en els nivells d'HDL per augment del seu catabolisme i per un augment de l'excreció renal

de la seva principal proteïna, l'ApoA1 (Grundy, 1998; Lewis i Rader, 2005; Ginsberg i col., 2006). A més, es produeix un fenomen de hiperlipèmia postprandial, mantenint-se elevats els nivells de triglicèrids en sang més temps del normal en els períodes postprandials (Krauss, 2004). Totes aquestes alteracions converteixen la dislipèmia aterogènica en un factor de risc molt important de la malaltia cardiovascular i coronària, fet pel qual és molt important buscar nous tractaments que previnguin el seu desenvolupament.

Com a la majoria de patologies metabòliques, el tractament principal per corregir la dislipèmia i evitar el seu desenvolupament cap al síndrome metabòlic i/o diabetis mellitus de tipus 2, consisteix en la correcció dels factors que les originen, és a dir, la instauració d'una dieta equilibrada i l'augment de l'activitat física. Sovint, però, aquestes mesures no són suficients i s'ha de recórrer al tractament farmacològic.

Actualment es troben al mercat diversos tipus de fàrmacs hipolipemians que redueixen la concentració plasmàtica de lipoproteïnes disminuint la seva síntesi o incrementant la seva eliminació. Un dels fàrmacs més prescrits són els inhibidors de la hidroximetilglutaril-CoA reductasa (HMG-CoA reductasa) també anomenats estatines. Aquests fàrmacs actuen inhibint l'HMG-CoA reductasa que és un enzim clau en la biosíntesi de colesterol. Així, les estatines com per exemple l'atorvastatina, la simvastatina i la fluvastatina, disminueixen significativament els nivells plasmàtics de LDL, també redueixen de forma moderada els triglicèrids i, fins i tot, poden augmentar els nivells plasmàtics d'HDL (Zhou i Liao, 2010).

Altres tipus de fàrmacs que s'utilitzen actualment en el tractament de les dislipèmies i el tractament de la diabetis mellitus tipus 2 són els activadors de l'anomenat PPAR (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor*) com és el cas dels fibrats i les tiazolidindiones. Els PPAR són factors de transcripció que regulen l'expressió de gens implicats en el metabolisme lipídic i de la glucosa (Boden i Laakso, 2004). Pertanyen a la superfamília dels receptors hormonals nuclears i poden ser activats per àcids grassos lliures naturals i xenobiòtics. Existeixen tres subtipus de PPARs, PPAR α , PPAR β/δ i PPAR γ , amb diferent distribució tissular i amb diferent implicació en el metabolisme lipídic.

PRESENTACIÓ

Els fibrats són lligands específics de PPAR α i són emprats principalment en el tractament de dislipèmia, especialment en la dislipèmia associada a diabetis i síndrome metabòlic. PPAR α juga un paper fonamental al fetge i a teixits amb gran capacitat de metabolitzar àcids grassos com el cor, el ronyó i el múscul esquelètic. L'activació de PPAR α a través de fibrats com el clofibrat, fenofibrat, bezafibrat i gemfibrozil regula gens implicats en la recaptació, l'activació i la β oxidació d'àcids grassos, augmentant el catabolisme de les VLDL i reduint la síntesi de triglicèrids i la producció hepàtica de VLDL. Així, l'administració de fibrats té un important efecte hipotrigliceremiant (Reddy, 2001) a més d'augmentar els nivells d'HDL i d'augmentar de mida les partícules de LDL i disminuir la seva densitat (Van Raalte i col., 2004; Blaschke i col., 2006). Els fibrats, a més dels seus efectes hipolipemians, també poden millorar l'homeòstasi de la glucosa (Pineda Torra i col., 1999).

D'altra banda les tiazolidindiones, com la rosiglitazona i la pioglitazona són activadors específics de PPAR γ . Aquest receptor nuclear s'expressa predominantment al teixit adipós tot i que també es pot trobar a altres teixits com l'intestí, ronyó, fetge i múscul esquelètic. PPAR γ és responsable de la diferenciació d'adipòcits i de la utilització metabòlica de la glucosa al teixit adipós (Desvergne i Wahli, 1999). L'activació de PPAR γ per part de les tiazolidindiones pot millorar la sensibilitat a la insulina, fet pel qual s'utilitzen principalment pel tractament de la diabetis mellitus de tipus 2. Tanmateix, les tiazolidindiones també poden millorar la dislipèmia associada a diabetis ja que redueixen els nivells de triglicèrids i àcids grassos plasmàtics per l'augment de la captació d'àcids grassos als adipòcits (Vàzquez i col., 2001).

Finalment, malgrat la diversitat de fàrmacs disponibles pel tractament de les dislipèmies i la diabetis mellitus de tipus 2, sovint aquests fàrmacs no són suficients per aturar el desenvolupament d'aquests trastorns i resulta necessari buscar noves dianes terapèutiques pel seu tractament.

En els últims anys s'ha proposat el subtipus PPAR β/δ com a nova diana terapèutica pel tractament de trastorns metabòlics associats al síndrome metabòlic. Fins ara, els efectes de l'activació de PPAR β/δ eren poc coneguts, probablement per la manca d'activadors específics. GW501516 va ser el primer lligand de PPAR β/δ d'alta

afinitat disponible, amb una selectivitat 1000 vegades superior a PPAR β/δ que sobre els altres subtipus de PPAR (Takahashi, 2006).

PPAR β/δ presenta una distribució més ubiqua als teixits que els altres subtipus de PPAR. La seva expressió és elevada al cor, al múscul esquelètic, teixit adipós, cèl·lules inflamatòries i pell (Wagner i Wagner, 2010). Encara que no es coneixen amb exactitud les seves funcions, diferents estudis l'atribueixen funcions similars a les de PPAR α , promovent l'oxidació i la utilització d'àcids grassos (Muoio i col., 2002) a cèl·lules musculars esquelètiques (Planavila i col., 2005; Gilde i col., 2003). De fet, estudis amb ratolins PPAR $\alpha^{-/-}$ van demostrar que la capacitat de β -oxidació al múscul esquelètic no es trobava afectada, possiblement per compensació per la presència de PPAR β/δ (Muoio i col., 2002). D'altra banda, altres estudis han demostrat que PPAR β/δ no sempre pot compensar les funcions de PPAR α (Huss i Kelley, 2004).

Al fetge, tot i que els efectes de PPAR β/δ són menys coneguts, se li atribueixen accions sobre el control del metabolisme de la glucosa i la sensibilitat a la insulina. Així, els ratolins PPAR $\beta/\delta^{-/-}$ presenten intolerància a la glucosa i ratolins diabètics estimulats amb agonistes PPAR β/δ mostren un increment de la sensibilitat a la insulina a la majoria de teixits (Lee i col., 2006). Així doncs, encara que els mecanismes implicats siguin poc coneguts, l'activació de PPAR β/δ per lligands d'alta afinitat com és GW501516, ha estat proposada pel tractament de la resistència a la insulina i el síndrome metabòlic. En aquest sentit, cal destacar que el tractament de micos obesos i amb resistència a la insulina amb GW501516 va incrementar un 79% els nivells de colesterol HDL mentre que va disminuir en un 56% els nivells de triglicèrids i en un 29% els nivells de colesterol LDL (Oliver i col., 2001). A més, un estudi més recent de Risérus i col. (2008) en humans, ha demostrat que l'administració de GW501516 durant 2 setmanes, disminuïa les concentracions plasmàtiques de triglicèrids.

D'altra banda, NF- κ B és un factor nuclear relacionat amb la inflamació i el desenvolupament de resistència a la insulina. Estudis recents del nostre grup d'investigació han demostrat que GW501516 inhibeix l'activitat del factor nuclear κ B per la inhibició de la proteïna ERK1/2 (*Extracellular signal-related kinase 1/2*) (Coll i col., 2006; Rodríguez-Calvo i col., 2008), reduint així la producció de citocines pro-

PRESENTACIÓ

inflamatòries implicades en el desenvolupament de resistència a la insulina. Es desconeix però si l'activació de PPAR β/δ pot reduir l'activació de NF- κ B a través d'altres mecanismes.

A més d'establir un lligand entre inflamació i resistència a la insulina, NF- κ B és un factor de transcripció ubic responsable de regular la resposta immune i la inflamació en diferents teixits. Per exemple, nombroses evidències indiquen que NF- κ B juga un paper principal en les patologies de l'epidermis amb base inflamatòria (Kaufman i Fuchs, 2000). Així, en malalties com la psoriasi i la dermatitis atòpica, els queratinòcits poden produir i respondre a mediadors inflamatoris com citocines i quimiocines a través de l'activació d'aquest factor de transcripció (Tan i col., 2001).

PPAR β/δ podria desenvolupar un paper molt important en els processos inflamatoris de la pell ja que ha estat demostrat que ratolins *knock-out* de PPAR β/δ presentaven una alteració en la resposta inflamatòria a la pell (Bishop-Bailey i Bistrom, 2009). A més, el fet de que PPAR β/δ sigui el subtipus de PPAR predominant als queratinòcits (Westergaard i col., 2003) també recolza l'important paper d'aquest receptor a aquest teixit. Tot això ha portat a proposar la utilització d'agonistes de PPAR, en especial del subtipus PPAR β/δ , pel tractament de diversos trastorns epidèrmics, en particular els que es caracteritzen per inflamació, hiperproliferació de queratinòcits i diferenciació aberrant, processos tots aquests implicats en el desenvolupament de la psoriasi (Michalik i Wahli, 2007).

Totes aquestes dades demostren la important implicació que té el subtipus PPAR β/δ en la regulació de la inflamació i l'homeòstasi lipídica. Per aquesta raó, l'estudi dels mecanismes pels quals els activadors de PPAR β/δ redueixen els nivells de triglicèrids o inhibeix el procés inflamatori en queratinòcits humans pot proporcionar una base científica que recolzi la utilització d'aquests fàrmacs al tractament de la dislipèmia aterogènica i el síndrome metabòlic i les malalties associades a processos inflamatoris en la pell com la psoriasi o la dermatitis atòpica.

INTRODUCCIÓ

1. RECEPTORS ACTIVATS PER PROLIFERADORS PEROXISÒMICS

La proliferació peroxisòmica es defineix com un increment en la densitat i volum dels peroxisomes i un augment en l'activitat de β -oxidació peroxisòmica dels àcids grassos (Desvergne i Wahli, 1999). Aquest fenomen es va descriure per primera vegada als anys 60 en un estudi amb rates tractades amb clofibrat (De Duve, 1969). Més tard es van identificar una sèrie de compostos amb característiques morfològiques i bioquímiques similars al clofibrat que van rebre el nom de proliferadors peroxisòmics (PPs). Quan a l'any 1990 es va clonar el primer receptor activat per aquests compostos (Isseman i Green, 1990) li van assignar el nom de Receptors Activats per Proliferadors Peroxisòmics (PPARs, *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*), perquè era el responsable de l'aparició d'aquest procés. Cal dir que aquest fenomen de la proliferació peroxisòmica s'observa quan s'administra fibrats a rosegadors però no en l'espècie humana.

Aquests PPARs són factors de transcripció dependents de lligand que pertanyen a la superfamília dels receptors nuclears hormonals. Els seus lligands naturals són els àcids grassos lliures i altres compostos endògens activats per determinats fàrmacs. Els PPARs regulen la transcripció de gens implicats en la regulació del metabolisme lipídic, en el metabolisme de la glucosa i d'aminoàcids, en el control de diferenciació cel·lular, en la resposta inflamatòria i en el desenvolupament del càncer. Aquesta diversitat d'accions suggereix que els PPARs són claus en l'estudi de diverses patologies, fet que ha estimulat el desenvolupament de nous fàrmacs activadors d'aquests PPARs pel seu tractament.

INTRODUCCIÓ

1.1 Estructura

Els PPARs, igual que la resta de receptors nuclears hormonals, presenten una estructura modular amb diferents dominis funcionals. En general presenten un domini A/B a la regió NH₂-terminal, un domini C o domini d'unió a l'ADN, un DBD (*DNA binding domain*), un domini D implicat en la interacció del receptor amb cofactors que regulen l'activitat transcripcional i un domini E que conté un domini d'unió dependent de lligand o LBD (*Ligand binding domain*) (Figura 2). Alguns receptors contenen també un domini F però la seva funció no és molt coneguda (Aranda i Pascual, 2001; Zoete i col. 2007).

El domini A/B es caracteritza per ser una regió molt variable que pot contenir un domini AF-1 (*Activation function-1*) responsable de la transactivació independent de lligand del receptor. D'altra banda el DBD i el LBD són les regions més altament conservades dels receptors nuclears. El DBD està format per dos dits de zinc que tenen la capacitat d'unir-se específicament als elements de resposta de PPAR (PPRE) després de formar-se un heterodímer amb el receptor de l'àcid 9-cis-retinòic (RXR). La unió amb RXR és indispensable per la unió de PPAR a l'ADN (Blanquart i col., 2003; Zoete i col. 2007). La regió reguladora PPRE està formada per 6 nucleòtids i consisteix en dos repeticions directes de la seqüència consensus AGGTCA separades per un únic nucleòtid anomenat element DR-1 (*Direct repeat 1*) (Varanasi i col., 1996).



Figura 2. Representació esquemàtica de l'estructura dels PPARs. Els PPARs estan organitzats en diferents dominis amb funcions específiques. *Blanquart i col. (2003)*

Finalment, el LBD està localitzat a l'extrem C-terminal del receptor i conté la funció d'activació-2 (AF-2) (Figura 2). La divergència en la seqüència d'aminoàcids en el LBD és la responsable de la selectivitat pels diferents lligands (Moras i Gronemeyer, 1998).

1.2 Subtipus

La família dels PPARs està formada per tres subtipus codificats per gens independents: PPAR α (NR1C1, segons el sistema unificat de nomenclatura per la superfamília dels receptors nuclears), PPAR β/δ (NR1C2) i PPAR γ (NR1C3), amb diferent distribució tissular i amb diferent implicació en el metabolisme lipídic i amb múltiples funcions cel·lulars (Michalik i col., 2006). En general, els PPARs tenen com lligands naturals i agonistes els àcids grassos i els seus derivats, incloent una gran varietat d'eicosanoids i prostaglandines.

1.3 Distribució tissular i lligands

PPAR α

PPAR α presenta nivells elevats d'expressió a teixits amb gran activitat catabòlica com el teixit adipós marró, fetge, cor, ronyó, múscul esquelètic i intestí (Braissant, 1996; Michalik i col., 2006, Burri i col., 2010). A més, PPAR α també s'expressa a macròfags (Chinetti i col., 1998), cèl·lules endotelials (Inoue i col., 1998) i cèl·lules de la musculatura llisa (Staels i col., 1998).

Entre els seus lligands naturals es troben una gran varietat d'àcids grassos saturats com l'àcid araquidònic, linoleic i oleic, i àcids grassos insaturats com l'àcid palmític (Berger i Moller, 2002). Recentment s'ha identificat un nou lligand endogen

INTRODUCCIÓ

especialment rellevant al fetge, el 16:0/18:1-GPC (*1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine*). La interacció d'aquest lligand amb els altres subtipus de PPAR és quasi inexistent. En canvi, tant l'addició de 16:0/18:1-GPC a cultius cel·lulars d'hepatoma (Hepa 1-6) com la seva infusió directament a la vena porta en ratolins, incrementa l'expressió hepàtica de gens diana de PPAR α i és capaç de reduir l'esteatosi hepàtica d'aquests animals (Chakravarthy i col., 2009). D'altra banda, PPAR α també pot ser activat per altres compostos com el leucotriè 4 (LTB₄), els àcids hidroieicosatetraenoics (HETEs) i fàrmacs com els fibrats (fàrmacs hipolipemians com el clofibrat, fenofibrat i gemfibrozil), herbicides i solvents (González i col., 2007; Pyper i col. 2010).

PPAR β/δ

La distribució tissular de PPAR β/δ és molt ubiqua a tot l'organisme encara que presenta nivells d'expressió més elevats a cor, múscul esquelètic, teixit adipós, cèl·lules inflamatòries i pell (Wagner i Wagner, 2010). PPAR β/δ és el subtipus menys estudiat i els seus efectes són poc coneguts. Tot i així, la seva extensa distribució a l'organisme suggereix la seva implicació en múltiples funcions biològiques. De fet, diversos estudis mostren la implicació de PPAR β/δ en diferents processos com en el desenvolupament embrionari, el metabolisme lipídic a teixits perifèrics i en la proliferació, diferenciació i supervivència cel·lular (Michalik i col., 2004).

En relació a l'estructura cal destacar que PPAR β/δ presenta una cavitat d'unió al domini LBD de dimensions significativament inferiors als altres dos subtipus de PPAR, PPAR α i PPAR γ , que presenten una cavitat d'unió de mida i forma similar entre ells. Aquesta diferència podria explicar perquè s'han identificat menys lligands específics de PPAR β/δ en comparació amb PPAR α i PPAR γ i indicaria la importància de la mida d'aquesta cavitat per la especificitat de cada subtipus (Xu i col., 2001; Michalik i col., 2006).

Entre els lligands naturals de PPAR β/δ es troben els àcids grassos, els eicosanoids (especialment les prostaciclins) i l'àcid retinoic. Entre els compostos sintètics s'inclouen GW0742, GW2433, GW9578, L-782483, L-165041 o GW501516. D'altra banda, també s'han identificat altres compostos que poden actuar com antagonistes de PPAR β/δ , com el fàrmac antiinflamatori no esteroideu sulindac o el compost GSK0660 (Bishop-Bailey i Wray, 2003; Wagner i Wagner, 2010).

PPAR γ

A humans, PPAR γ s'expressa com tres isoformes diferents però amb idèntica funció biològica, PPAR γ 1, PPAR γ 2 i PPAR γ 3 (Fajas i col., 1998; Houseknecht i col., 2002). PPAR γ és responsable, principalment, de controlar la diferenciació adipocitària i la utilització metabòlica de la glucosa. PPAR γ 1 s'expressa principalment a l'intestí gros, a cèl·lules hematopoètiques i al teixit adipós (Picard i Auwerx, 2002; Rangwala i Lazar, 2004). També és l'isoforma predominant al ronyó, fetge, múscul esquelètic, múscul llis, pàncrees i intestí prim (Picard i Auwerx, 2002). PPAR γ 2 s'expressa quasi exclusivament al teixit adipós (Escher i col., 2001) i PPAR γ 3 a l'intestí gros i macròfags (Fajas i col., 1998).

PPAR γ pot ser activat per diversos lligands naturals i sintètics. Els lligands endògens descrits per a PPAR γ han estat els àcids grassos poliinsaturats (àcid linoleic, linolènic, araquidònic i eicosapentanoic) (Xu i col, 2001; Waku i col, 2009), un derivat de la prostaglandina D2 (15-deoxi- Δ 12,14-PGJ2) (Bell-Parikh i col., 2003) i els metabòlits oxidats derivats de l'àcid linoleic presents a les LDL, (l'àcid 9-hidroxi-octadecadienoic (9-HODE) i el 13-HODE) (Nagy i col., 1998; Waku i col, 2009).

Entre els lligands sintètics cal destacar les tiazolidindiones (TZD). Aquests fàrmacs són activadors específics de PPAR γ i gràcies a les seves propietats de millora de la sensibilitat a la insulina s'utilitzen en el tractament de la diabetis mellitus de tipus 2. Entre aquests compostos es troben la rosiglitazona, i la pioglitazona (Moller i Greene, 2001). També s'ha observat que alguns fàrmacs antiinflamatoris no-

INTRODUCCIÓ

esteroideus com l'indometacina, el fenoprofè i l'ibuprofè, poden activar PPAR γ però de manera més feble (Lehmann i col., 1997).

1.4 Mecanismes d'acció dels PPAR

Els PPARs poden regular l'activitat transcripcional dels seus gens diana per dos mecanismes principals, la trans-activació i la trans-repressió.

1.4.1 Trans-activació

Els PPAR, a la seva localització nuclear, es troben formant un heterodímer amb el receptor de l'àcid 9-cis retinoic, RXR α , unit a les regions PPRE dels seus gens diana i a molècules corepressores (Viswakarma i col., 2010). En absència de lligand, l'heterodímer PPAR-RXR es manté unit a dos molècules corepressores ben caracteritzades, el receptor nuclear corepressor (NCoR) i el mediador silenciador del receptor d'hormones retinoides i tiroïdals (SMRT) (Karagianni i Wong, 2007). Ambdós molècules interactuen directament amb el complex Sin3 per formar un complex corepressor (Nagy i col., 1997). D'altra banda, SMRT facilita el reclutament de la histona desacetilasa (HDAC) i la seva unió al promotor de l'ADN (Nagy i col., 1997). El complex corepressor inhibeix la transcripció dels gens diana per desacetilació de les histones.

En la trans-activació els PPARs actuen com factors transcripcionals dependents de lligand. L'activació de l'heterodímer PPAR-RXR per un lligand desencadena canvis conformationals al receptor que allibera el complex corepressor i permet la unió de coactivadors a la regió promotora dels gens diana per iniciar la transcripció (Xu i col., 2001).

Els coactivadors transcripcionals incrementen la transcripció a través de l'acetilació de les histones i del reclutament i estabilització dels complexos transcripcionals involucrats (Viswakarma i col., 2010). La majoria de coactivadors estan formats per un o més motius LXXLL (L, leucina i X, qualsevol aminoàcid) alguns dels quals són necessaris per la unió d'alguns coactivadors al LBD del receptor nuclear (Heery i col., 1997). L'assemblatge o pre-assemblatge del complex coactivador facilita que el PPAR unit al lligand activi la transcripció dels seus gens dianes.

Alguns coactivadors exerceixen la seva funció per activitat enzimàtica, com per exemple per acetilació d'histones amb activitat acetil-transferasa d'histones (HAT) (Figura 3A), en aquesta classe es troben els coactivadors del receptors esteroideus de la família p160 (p160/SRC) i els coactivadors CBP/p300 (Viswakarma i col., 2010). Altres coactivadors o proteïnes associades a coactivadors amb activitat enzimàtica són els coactivadors CARM (activitat metiltransferasa), PRIC285, p68 (activitat helicasa) i PRIC320, SW1/SNF (remodeladors de cromatina dependents d'ATP). D'altra banda, alguns coactivadors no exerceixen cap activitat enzimàtica com PGC1- α (*PPAR γ coactivator1- α*), PGC1- β (*PPAR γ coactivator1- β*) i les subunitats BAFs (Viswakarma i col., 2010).

1.4.2 Trans-repressió

Un altre mecanisme pel qual els PPARs poden regular la transcripció gènica és per un mecanisme de trans-repressió. Aquest mecanisme és, en la majoria dels casos, el responsable dels efectes antiinflamatoris dels PPARs (Blanquart i col., 2003). A través d'aquest mecanisme independent de la unió a l'ADN, els PPARs poden interferir les vies d'altres factors de transcripció (Figura 3B) (Panadero i col., 2008), com és el cas del factor nuclear κ B (NF- κ B), els transductors de senyal i activadors de la transcripció (STATs), l'activador de proteïna-1 (AP-1) i el factor nuclear de cèl·lules T activades (NFAT) (Daynes i Jones, 2002).

INTRODUCCIÓ

Existeixen tres vies principals per les quals l'heterodímer PPAR-RXR activat per lligand pot interferir en l'activitat d'altres factors de transcripció. El primer mecanisme és conseqüència d'una competició per quantitats limitades de coactivadors compartits. Sota aquestes condicions en les quals els nivells de coactivadors específics són el factor limitant, l'activació de PPAR suprimeix l'activitat dels altres factors de transcripció que utilitzen el mateix coactivador (Li i col., 2000). En el segon mecanisme, anomenat "antagonisme mutu de receptors", els heterodímers PPAR-RXR activats actuen a través d'interaccions físiques amb altres factors de transcripció (AP-1, NF- κ B, NFAT o STAT). Aquesta associació impedeix la unió del factor de transcripció pro-inflamatori al seu element de resposta i, per tant, s'inhibeix la seva capacitat per induir la transcripció gènica (Delerive i col., 1999). I per últim, el tercer mecanisme consisteix en la inhibició de la fosforilació i l'activació de certs membres de la cascada MAPK (*Mitogen activated protein kinase*), pels heterodímers PPAR-RXR activats, evitant així que les MAPK puguin activar altres factors de transcripció (Daynes i Jones, 2002).

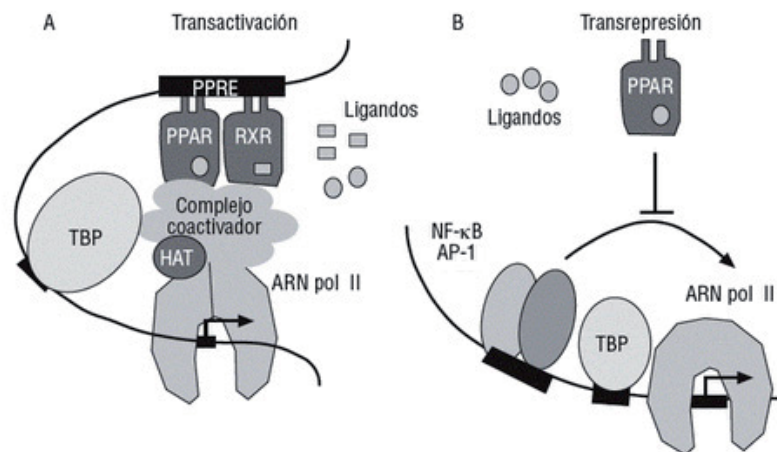


Figura 3. Mecanismes d'acció dels PPAR. **A.** Trans-activació. L'heterodímer PPAR-RXR activat es pot associar a coactivadors amb activitat HAT que acetilen les histones i faciliten la transcripció. **B.** Trans-repressió. L'heterodímer PPAR-RXR activat interfereix en l'activitat d'altres factors de transcripció. *Panadero i col. (2008).*

1.4.3 Factors que afecten l'activitat PPAR

L'activitat dels PPARs també resulta influenciada per d'altres factors, com la seva expressió en un determinat teixit, i per processos com la fosforilació i la ubiquitinització.

Fosforilació

Els PPARs són fosfoproteïnes que poden regular la seva activitat per fosforilació. Així, com a resposta a la insulina, es pot fosforilar PPAR α , afavorint la seva fosforilació i millorant la seva activitat transcripcional (Shalev i col., 1996). Aquesta fosforilació de PPAR α es produeix sobre les serines 12 i 21 a través de la via MAPK i en conseqüència PPAR α pot augmentar la seva interacció amb el coactivador transcripcional PGC-1 (Juge-Aubry i col., 1999; Barger i col., 2001).

D'altra banda, al contrari de PPAR α , canvis en l'estat de fosforilació de PPAR γ a través de la via MAPK poden provocar la inhibició de la seva activitat transcripcional (Hu i col., 1996).

Ubiquitinització

La degradació a través del sistema ubiquitina-proteasoma pot afectar l'activitat de diferents receptors nuclears. En el cas dels PPARs, la seva degradació dels PPARs pel sistema ubiquitina-proteasoma modula la intensitat de la resposta del lligand mitjançant el control dels nivells de proteïna PPAR de les cèl·lules (Blanquart i col., 2003).

Les proteïnes degradades pel sistema ubiquitina-proteasoma són covalentment modificades als residus de lisina per fixació d'un polipèptid de 8 KDa anomenat ubiquitina. El procés consta de 3 passos. Primer la ubiquitina és activada per l'enzim

INTRODUCCIÓ

activador d'ubiquitina, E1. A continuació la ubiquitina activada és transferida a una proteïna transportadora E2 i, finalment, la proteïna ubiquitina-ligasa E3 catalitza la unió covalent de la ubiquitina a la proteïna diana. Finalment, les proteïnes multi-ubiquitinades es degraden ràpidament al proteasoma 26S (Blanquart i col., 2003).

L'activació de PPAR γ per determinants lligands pot produir la degradació d'aquest receptor nuclear per aquesta via (Hauser i col., 2000). També PPAR α pot ser degradat pel sistema ubiquitina-proteasoma però, al contrari de PPAR γ , l'activació de PPAR α pels seus lligands el protegeix de la degradació per ubiquitinització (Blanquart i col., 2002).

1.5 PPAR α

PPAR α va ser el primer subtipus de la família dels PPARs que es va identificar i és un dels isotips més àmpliament estudiats (Pyper i col., 2010).

Implicació de PPAR α en el metabolisme lipídic

PPAR α juga un paper clau en el metabolisme lipídic sent responsable de regular la captació, activació i β -oxidació dels àcids grassos (Berger i Moller, 2002; Burri i col., 2010; Pyper i col., 2010) (Figura 4). Això és degut a que PPAR α regula l'expressió de proteïnes implicades en el transport intra- i extra- cel·lular d'àcids grassos, l'activació dels àcids grassos, la β -oxidació d'àcids grassos a peroxisomes i mitocòndries i la ω -oxidació a microsomes, la lipogènesi, la síntesi de cossos cetònics i la termogènesi (Desvergne i Wahli, 1999; González, 2007). Així, entre els seus gens diana es troben les proteïnes FATP (*fatty acid transport protein*) i FAT (*fatty acid translocase*) involucrades en el transport d'àcids grassos a través de la membrana; els enzims ACC (*acetyl-CoA carboxylase*), FAS (*fatty acid synthase*) i SCD-1 (*stearoyl-CoA desaturase-1*) implicats en la síntesi de novo d'àcids grassos; l'enzim CPT-I (*carnitine palmitoyl transferase-I*) i la

MCAD (*medium chain acyl-desaturase*) claus en la β -oxidació mitocondrial i l'ACO (*acyl-CoA oxidase*) de la β -oxidació peroxisòmica i l'enzim HMG-CoA sintasa (3-hidroxi-3-metilglutaril CoA sintasa) implicat en la formació de cossos cetònics (González i col., 2007).

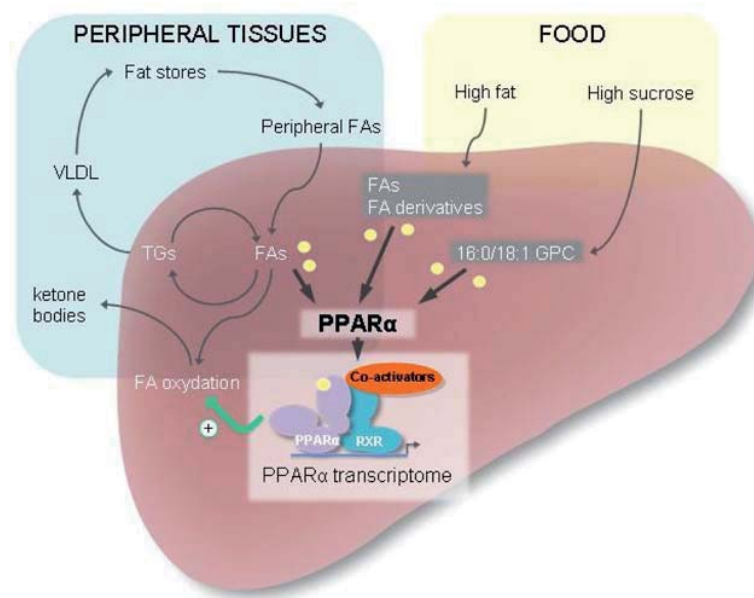


Figura 4. Esquema representatiu de l'activació de PPAR α per lligands al fetge: Àcids grassos i producció de 16:0/18:1 GPC. L'activació de PPAR α indueix l'expressió de gens implicats en la β -oxidació d'àcids grassos i altres vies metabòliques com la producció de cossos cetònics. FA, àcids grassos; 16:0/18:1 GPC, 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfocolina; TG, triglicèrids; VLDL, lipoproteïna de molt baixa densitat. *Yessoufou i Wahli (2010)*.

A nivell hepàtic PPAR α és el subtipus més estudiat (Burri i col, 2010). L'activació de PPAR α per fàrmacs hipolipemiants com els fibrats disminueix els nivells de triglicèrids plasmàtics augmentant la β -oxidació hepàtica i reduint la síntesi i secreció de triglicèrids en forma de VLDL (Guerre-Millo i col., 2000). A més, també indueixen l'expressió de les apoproteïnes Apo A-I i Apo A-II, presents de manera majoritària a l'HDL, afavorint el transport revers de colesterol (Vu-Dac i col., 1994). D'altra banda, una reducció en l'oxidació d'àcids grassos en aquest teixit, com a conseqüència d'un descens en l'activitat de PPAR α , pot promoure l'acumulació de lípids en forma de

INTRODUCCIÓ

triglicèrids. De fet, estudis realitzats amb rates alimentades amb fructosa, mostren un increment en els nivells hepàtics de triglicèrids com a conseqüència d'una reducció dels nivells d'ARNm i l'activitat PPAR α (Roglans i col., 2002).

Implicació de PPAR α en l'homeòstasi de la glucosa

Estudis amb ratolins PPAR α ^{-/-} han demostrat que aquests animals presenten hipoglucèmia en dejú deguda a una disminució de la capacitat de gluconeogènesi hepàtica i de la β -oxidació d'àcids grassos (Kersten i col., 1999; Im i col. 2010). A més, s'ha demostrat que l'administració de fibrats millora la sensibilitat a la insulina i l'homeòstasi de la glucosa. Totes aquestes dades suggereixen un important paper de PPAR α en el metabolisme glucídic (Pineda Torra i col., 1999; Guerre-Millo i col., 2000).

Implicació de PPAR α en la inflamació

Estudis recents han demostrat que PPAR α també modula el control de la resposta inflamatòria (Pozzi i col., 2007; Smeets i col., 2008). En aquest sentit cal indicar que un dels agents quimiotàctics més potents coneguts que participa en el reclutament de leucòcits en processos d'inflamació, el LTB4 és capaç d'activar PPAR α , induint així l'expressió de gens implicats en la ω - i β -oxidació, que afavoreixen el seu propi catabolisme, i en conseqüència, limiten el procés inflamatori (Devchand i col., 1996; Delerive i col., 2001). A més, altres estudis en humans tractats amb fibrats, mostren que l'activació de PPAR α pot inhibir la resposta inflamatòria per inducció de l'apoptosi de macròfags activats per citocines, inhibició del factor de transcripció NF- κ B o disminució dels nivells plasmàtics d'interleucina-6 (IL-6) (Delerive i col., 2001; Moller i Berger, 2003).

1.6 PPAR β/δ

PPAR β/δ és el subtipus de PPAR més àmpliament distribuït a tot l'organisme (Yessoufou i Wahli, 2010; Wagner i Wagner, 2010). Aquest subtipus es va anomenar inicialment PPAR β quan es va identificar per primera vegada a *Xenopus* per Dreyer i col. (1992). Posteriorment es va identificar també a humans (Schmidt i col., 1992) i més tard a ratolins (Kliwer i col., 1994) i rates (Mukherjee i col., 1994) rebent un nom diferent, PPAR δ , ja que la seva seqüència proteica mostrava diferències amb la de *Xenopus*. Més tard Takada i col. van demostrar que el gen de PPAR δ en mamífers i el gen PPAR β d'amfibis eren ortòlegs, és a dir, ambdós gens tenen el mateix origen evolutiu i les mateixes funcions biològiques (Takada i col., 2000) fet pel qual aquest receptor es coneix actualment com PPAR β/δ .

Implicació de PPAR β/δ en el metabolisme de les lipoproteïnes

La utilització d'agonistes específics de PPAR β/δ com GW501516 ha ajudat a conèixer les funcions biològiques d'aquest subtipus. En aquest sentit, el tractament amb GW501516 de micos obesos i amb resistència a la insulina va mostrar un increment del 79% en els nivells de colesterol HDL mentre que es va observar una reducció dels nivells de triglicèrids i colesterol LDL del 56% i del 29%, respectivament (Oliver i col., 2001). Aquestes dades suggereixen que PPAR β/δ és un important regulador del metabolisme lipídic. A més, el canvi produït sobre les lipoproteïnes (especialment les LDL), alterant la seva mida i composició, proporciona un perfil lipídic menys aterogènic, disminuint així el risc cardiovascular (Oliver i col., 2001). D'altra banda, en aquests primats, que també presentaven resistència a la insulina, es va observar una disminució dels nivells d'insulina plasmàtics. Tots aquests efectes suggereixen que el tractament amb agonistes de PPAR β/δ pot disminuir la incidència de malalties cardiovasculars associades al síndrome metabòlic.

INTRODUCCIÓ

A més, estudis recents en humans (Risérus i col., 2008) han demostrat que l'administració de GW501516 durant dues setmanes a pacients amb obesitat abdominal i dislipèmia moderada, produïa una disminució de les concentracions plasmàtiques de triglicèrids, colesterol LDL i insulina.

D'altra banda, l'activació de PPAR β/δ també pot reduir l'absorció de colesterol intestinal, en part per reducció en l'expressió de la proteïna intestinal Npc1L1 (*Niemann-Pick C1-Like1*), que també és diana del fàrmac ezetimiba, inhibidor de l'absorció intestinal de colesterol (Barish i col., 2006).

Funcions de PPAR β/δ en el teixit adipós

L'increment dels adipòcits de teixit adipós, especialment a la regió abdominal, es troba directament relacionat amb l'aparició de resistència a la insulina. Tanmateix, s'ha demostrat que una pèrdua de pes redueix l'aparició de factors de risc que afavoreixen el síndrome metabòlic (Barish i col., 2006).

Estudis amb ratolins transgènics VP16-PPAR β/δ han demostrat que PPAR β/δ juga un paper molt important en el metabolisme del teixit adipós i el control de pes. Aquests animals sobreexpressen constitutivament al teixit adipós la proteïna VP16-PPAR β/δ que és el resultat de fusionar la proteïna VP16, activador de la transcripció en el virus de l'herpes simple, i el receptor nuclear PPAR β/δ . En aquest estudi es va observar que després d'administrar una dieta estàndard, els ratolins transgènics presentaven un pes un 20% inferior, una reducció de l'acumulació de triglicèrids als adipòcits i nivells reduïts d'àcids grassos i triglicèrids en plasma en comparació amb els ratolins control. A més, la sobreexpressió de VP16-PPAR β/δ va ser capaç de protegir contra l'obesitat els animals sotmesos a una dieta rica en greixos. A nivell transcripcional, es va observar un increment al teixit adipós de l'expressió de gens implicats en la β -oxidació dels àcids grassos, la lipòlisi i en el desacoblament d'energia a la mitocòndria (Wang i col., 2003; Barish i col., 2006). Altres estudis amb agonistes de

PPAR β/δ a cultius de preadipòcits 3T3-L1 van mostrar un increment d'un 50% en la β -oxidació dels àcids grassos (Wang i col., 2003).

Funcions de PPAR β/δ en el múscul esquelètic

El múscul esquelètic és un dels teixits clau en el metabolisme energètic. Aproximadament el 80% de la captació de glucosa dependent d'insulina es produeix en aquest teixit (Barish i col., 2006). El múscul esquelètic està format per dos tipus de fibres amb diferents propietats contràctils i metabòliques: fibres tipus I oxidatives i de contracció lenta i fibres de tipus II de contracció ràpida, que es subdivideixen en glicolítiques-oxidatives (IIA) i glicolítiques (IIB) (Pette i Staron, 2000).

PPAR β/δ és l'isoforma de PPAR que més s'expressa al múscul esquelètic i en especial a les fibres oxidatives, que principalment expressen enzims implicats en l'oxidació d'àcids grassos (Pette i Staron, 2000). La sobreexpressió de PPAR β/δ en aquest teixit induïx la remodelació de les fibres incrementant el percentatge de fibres oxidatives i augmentant l'expressió i l'activitat d'enzims oxidatius (Luquet, 2003). En conseqüència, aquest augment de fibres oxidatives pot reduir la fatiga muscular a més de prevenir l'obesitat induïda per una dieta rica en greixos (Luquet, 2003). De manera similar, l'activació de PPAR β/δ amb GW501516 en cultius de miotubs L6 i en cèl·lules C2C12 produeix un increment de l'expressió de gens implicats en el metabolisme oxidatiu (Tanaka i col., 2003; Barish i col., 2006). A més, també a cèl·lules C2C12, l'administració de GW501516 redueix la inflamació i la resistència a la insulina induïda per àcids grassos (Coll i col., 2010).

Diversos estudis atribueixen a PPAR β/δ funcions similars a PPAR α respecte a la promoció de l'oxidació i la utilització d'àcids grassos (Muoio i col., 2002) a cèl·lules musculars esquelètiques (Planavila i col., 2005; Gilde i col., 2003). Així, estudis amb ratolins PPAR $\alpha^{-/-}$ van demostrar que la capacitat de β -oxidació al múscul esquelètic no es trobava afectada, possiblement per compensació per la presència de PPAR β/δ

INTRODUCCIÓ

(Muio i col., 2002) tot i que altres estudis han demostrat que no sempre és així (Huss i Kelley, 2004).

Altres estudis *in vitro* també mostren que el tractament amb agonistes de PPAR β/δ en cèl·lules humanes de múscul esquelètic augmenta la captació de glucosa independent d'insulina (Kramer i col., 2005). En conseqüència amb aquestes dades, els ratolins PPAR $\beta/\delta^{-/-}$ presenten intolerància a la glucosa i ratolins diabètics estimulats amb agonistes PPAR β/δ mostren un increment de la sensibilitat a la insulina a la majoria de teixits (Lee i col., 2006).

Funcions de PPAR β/δ en el cor

La β -oxidació dels àcids grassos és la principal font d'energia del cor en el període postnatal (Barger i col., 2000). A diferència d'altres teixits com el cervell, el cor té la capacitat d'adaptar el seu substrat energètic segons la seva disponibilitat. Així, en una situació d'hipertròfia cardíaca o d'insuficiència cardíaca congestiva, la utilització de glucosa com substrat metabòlic augmenta en detriment dels àcids grassos (Allard i col., 1994; Kagaya i col., 1990)

De manera similar al múscul esquelètic, l'activació de PPAR β/δ al cor pot regular la β -oxidació dels àcids grassos (Yessoufou i Wahli, 2010). Estudis de Gilde i col. (2003) van mostrar que tant PPAR α com PPAR β/δ juguen un paper principal en el metabolisme lipídic cardíac (Gilde i col., 2003). A més, la utilització de l'agonista de PPAR β/δ , GW0742, en cardiomiòcits aïllats de ratolins PPAR $\alpha^{-/-}$, va restaurar parcialment l'expressió de gens implicats en la β -oxidació d'àcids grassos (Cheng i col., 2004b).

D'altra banda, altres estudis han demostrat que la deficiència específica de PPAR β/δ al cor pot provocar l'aparició d'hipertròfia cardíaca, suggerint que aquest subtipus és essencial per l'expressió constitutiva d'enzims implicats en la β -oxidació d'àcids grassos i per mantenir el balanç energètic i la funció cardíaca normal (Cheng i col., 2004a). A més, estudis del nostre grup d'investigació han mostrat que l'activació

de PPAR β/δ per L-165041 inhibeix la hipertròfia cardíaca induïda per fenilefrina a cardiomiòcits neonatals de rata (Planavila i col., 2005).

Funcions de PPAR β/δ en el fetge

PPAR β/δ pot regular també el metabolisme de la glucosa i la sensibilitat a la insulina a través del seus efectes sobre el fetge (Lee i col., 2006). De fet, com s'ha comentat anteriorment, l'administració d'agonistes de PPAR β/δ a ratolins diabètics *db/db* produeix una millora en la sensibilitat a la insulina en la majoria dels teixits (Lee i col., 2006).

D'altra banda, recentment s'ha demostrat que l'activació de PPAR β/δ indueix la producció de glicogen i l'activació de la lipogènesi al fetge. Aquest augment de la síntesi lipídica però, afavoreix l'acumulació dels àcids grassos i/o la seva conversió cap espècies lipídiques menys tòxiques, protegint així el fetge de la seva lipotoxicitat. De fet, l'activació de PPAR β/δ indueix la síntesi d'àcids grassos monoinsaturats en detriment dels àcids grassos saturats (Liu i col., 2010). Així, tot i haver acumulació de lípids, el fetge presenta menys estrès cel·lular i una menor activació de la via JNK (*Jun N-terminal kinase*), proteïna quinasa pro-inflamatòria relacionada amb l'aparició de resistència a la insulina (Liu i col., 2010).

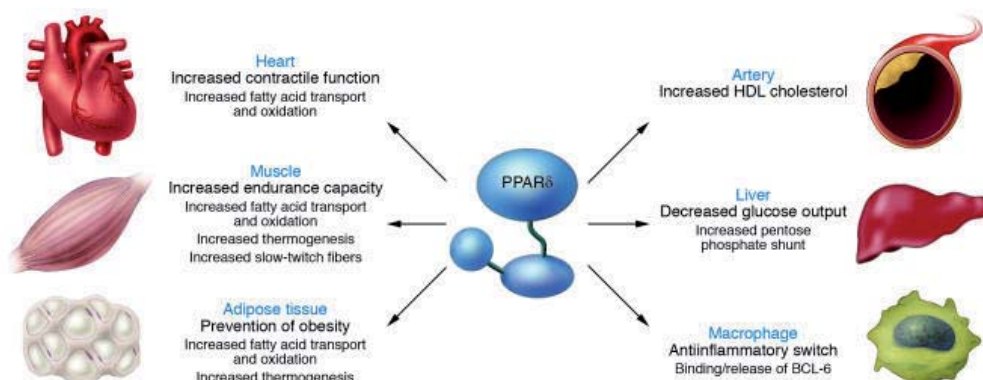


Figura 5. Representació esquemàtica dels efectes de PPAR β/δ en diferents teixits i cèl·lules. Barish i col. (2006).

INTRODUCCIÓ

PPAR β / δ i inflamació

Estudis recents de Piqueras i col. (2009) han demostrat que l'activació de PPAR β / δ amb GW501516 inhibeix tant *in vivo* com *in vitro* l'alliberament de TNF- α induït per la interacció de neutròfils amb cèl·lules endotelials. Aquest efecte antiinflamatori es produït, en part, per una disminució de l'expressió de molècules d'adhesió endotelials com la VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*), l'ICAM-1 (*Inter-Cellular Adhesion Molecule-1*) i l'E-selectina (Piqueras i col., 2009).

D'altra banda, PPAR β / δ pot controlar la resposta inflamatòria de monòcits/macròfags, implicada en el desenvolupament de l'aterosclerosi, per la seva associació i dissociació amb el repressor transcripcional BCL-6 (*B-Cell Lymphoma 6*) (Figura 6) (Lee i col., 2003). En absència de lligand, PPAR β / δ es troba físicament associat a BCL-6, reprimint la seva acció antiinflamatòria com corepressor transcripcional. En conseqüència, els nivells d'alguns mediadors inflamatoris com MCP-1 (*Monocyte Chemotactic Protein-1*), MCP-3 (*Monocyte Chemotactic Protein-3*) i IL-1 β (Interleucina-1 β) es troben incrementats. En canvi, l'activació de PPAR β / δ per un lligand permet la seva dissociació de BCL-6 i així queda lliure per actuar com repressor de les vies pro-inflamatòries (Lee i col., 2003; Bishop-Bailey i Bystrom, 2009).

Un altre mecanisme pel qual PPAR β / δ presenta efectes antiinflamatoris és per inhibició del factor de transcripció NF- κ B. Diversos estudis han demostrat que l'activació de PPAR β / δ pot inhibir NF- κ B a cèl·lules endotelials (Rival i col., 2002), a cardiomiòcits (Smeets i col., 2008) i adipòcits (Rodríguez-Calvo i col., 2008). De fet, estudis recents del nostre grup d'investigació han demostrat que l'activitat de NF- κ B es pot suprimir al teixit adipós per inhibició de la proteïna ERK1/2 (Rodríguez-Calvo i col., 2008), reduint així la producció de citocines pro-inflamatòries.

Finalment, PPAR β / δ també és capaç d'induir mediadors antiinflamatoris com TGF β (*Transforming Growth Factor β*) a cèl·lules de la musculatura llisa vascular (Kim i col., 2008). A més, pot induir gens antiapoptòtics i antioxidants com la superòxid dismutasa, la catalasa, la tioredoxina i la 14-3-3 α (Fan i col., 2008; Liou i col., 2006).

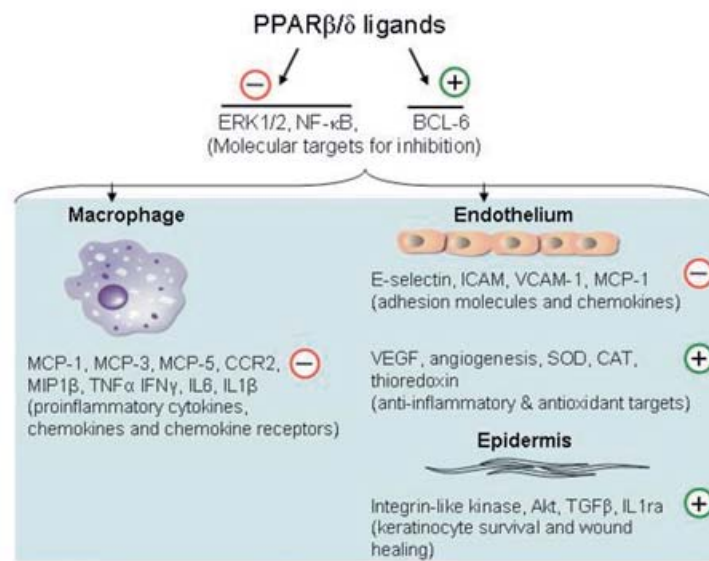


Figura 6. Efectes antiinflamatoris de PPAR β/δ . Lligands de PPAR β/δ induïen l'alliberament del corepressor BCL-6, inhibeix l'activitat de NF- κ B i ERK1/2 i induïen gens antiinflamatoris i antioxidants. *Yessoufou and Wahli (2010)*.

1.7 PPAR γ

Paper de PPAR γ en el teixit adipós

PPAR γ juga un paper principal en la diferenciació del teixit adipós, a més de mantenir les funcions específiques dels adipòcits com l'emmagatzematge de lípids al teixit adipós blanc i la dissipació d'energia al teixit adipós marró (Tontonoz i col., 1993 i 1994; Rosen i col., 2000; He i col., 2003; Koutnikova i col., 2003). De fet, estudis de Barak i col. (1999) descriuen que els ratolins PPAR $\gamma^{-/-}$ presenten una lipodistròfia extrema.

En adipòcits PPAR γ regula l'expressió de diversos gens implicats en el metabolisme lipídic com la proteïna adipocitària lligand d'àcids grassos aP2 (*Adipose*

INTRODUCCIÓ

protein 2); l'enzim fosfoenolpiruvat cinasa (PEPCK, de l'anglès *phosphoenolpyruvat carboxykinase*) implicat en la gluconeogènesi, l'acil-CoA sintetasa (ACS), i la lipoproteïna lipasa (LPL) (Tontonoz i col., 1994a). Altres estudis també han demostrat la seva participació en el control de l'expressió de proteïnes implicades en la captació de lípids als adipòcits, com és el cas de la FATP-1 i FAT/CD36 (Martin i col., 1997, Sfeir i col., 1997). D'altra banda, PPAR γ també inhibeix l'expressió de gens que indueixen la lipòlisi i l'alliberament d'àcids grassos com la leptina, una hormona secretada principalment pel teixit adipós i que, a més, regula la sensació de sacietat sobre l'hipotàlam (Berger i Moller, 2002). PPAR γ també regula l'homeòstasi energètica cel·lular incrementant l'expressió de les proteïnes desacobladores UCP-1, UCP-2 i UCP-3 (Kelly i col., 1998).

PPAR γ i resistència a la insulina

L'abundant expressió de PPAR γ , diana de les TZD, al teixit adipós, feia preveure un paper important d'aquest receptor nuclear en aquest teixit i per tant, sobre l'etiologia i el tractament de la resistència a la insulina (He i col., 2003; Doshi i col., 2010). De fet, la sobreexpressió de PPAR γ i la seva activació a través de TZD estimula la diferenciació del teixit adipós, resultant en un increment d'adipòcits més petits, que són més sensibles a la insulina que els adipòcits grans (Okuno i col., 1998).

PPAR γ indueix l'expressió d'una sèrie de gens implicats en el metabolisme i la captació de glucosa en els adipòcits, com el transportador de glucosa regulat per insulina, GLUT4, i la proteïna associada a c-CBL (CAP), necessària per la translocació de GLUT4 a la superfície de la cèl·lula (Baumann i col., 2000). Altres estudis mostren també que l'administració de TZD en cultius cel·lulars de 3T3-L1 i en cultius primaris d'adipòcits humans produeix un increment en l'expressió del receptor de la insulina IRS-2 (Smith, 2002).

D'altra banda, el teixit adipós actua com òrgan endocrí alliberant diverses adipocitocines com leptina, resistina, adiponectina, IL-6, TNF- α i àcids grassos cap a

altres teixits (Hsueh i Law , 2003). Cal destacar que PPAR γ pot regular l'expressió de gens implicats en la senyalització del teixit adipós cap altres teixits, especialment sobre el fetge i el múscul esquelètic. Així, l'administració d'agonistes de PPAR γ pot inhibir l'expressió gènica de la leptina (Kallen i Lazar, 1996), la resistina (Steppan i col., 2001) l'inhibidor de l'activador del plasminogen (PAI-1) (Gottschling-Zeller i col., 2000), TNF- α (Peraldi i col., 1997) i IL-6 (Sigrist i col., 2000), contribuint a disminuir la resistència a la insulina en fetge i múscul esquelètic. A més, l'activació de PPAR γ indueix la secreció d'adiponectina, una hormona que afavoreix la sensibilitat a la insulina en altres teixits i en el propi teixit adipós (Maeda i col., 2001).

Aquestes dades mostren com l'activació de PPAR γ contribueix al tractament de la resistència a la insulina per millora de la sensibilitat a la insulina, especialment a través dels seus efectes sobre el teixit adipós. D'altra banda, tot i que PPAR γ s'expressa a nivells molt inferiors a múscul esquelètic i fetge, l'administració de TZD també contribueix a la millora de la sensibilitat a la insulina mitjançant accions directes sobre aquests teixits (Figura 7). De fet, l'administració de TZD disminueix la captació d'àcids grassos al fetge i, en conseqüència, també redueix la gluconeogènesi (Willson i col., 2001; Doshi i col., 2010). Altres estudis han demostrat efectes directes de les TZD sobre cultius de miotubs L6 (Ciaraldi i col., 1990) i sobre cultius de cèl·lules de múscul esquelètic humà (Kausch i col., 2001). A més, s'ha demostrat que l'administració de troglitazona pot reduir la síntesi de *novo* de ceramides, un derivat lipídic que pot dipositar-se al múscul esquelètic quan hi ha excés d'àcids grassos lliures i alterar la via de senyalització de la insulina. De fet, aquestes ceramides poden produir la degradació de l'Akt, una proteïna implicada en promoure la captació de glucosa a través de la translocació de Glut4 a la membrana plasmàtica per activació de la insulina. L'administració de troglitazona inhibeix la formació de ceramides evitant la degradació de l'Akt i contribuint així a la millora de la sensibilitat a la insulina al múscul esquelètic (Planavila i col., 2005).

INTRODUCCIÓ

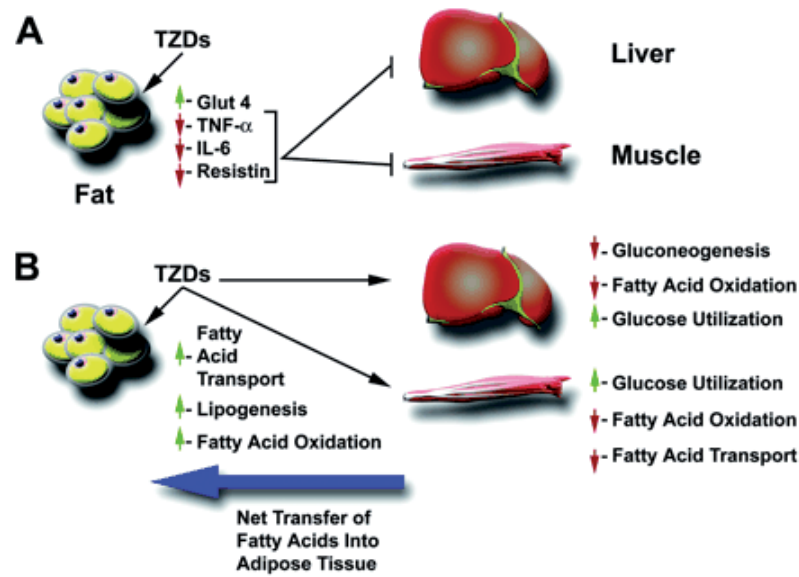


Figura 7. L'administració de TZD millora la sensibilitat a la insulina. **A.** Les TZD actuen principalment sobre el teixit adipós augmentant la captació de glucosa i disminuint l'alliberament de citocines que actuen sobre fetge i múscul esquelètic. **B.** Les TZD actuen directament sobre altres teixits redistribuint els àcids grassos del fetge i múscul esquelètic cap al teixit adipós. *Rosen i Spiegelman (2001).*

PPAR γ i inflamació

PPAR γ juga un paper fonamental a la resposta immune a través de la seva capacitat d'inhibir citocines pro-inflamatòries i de dirigir la diferenciació d'algunes cèl·lules immunes cap a fenotips antiinflamatoris (Martin, 2010).

L'administració d'agonistes de PPAR γ redueix l'activació i la inflamació en cèl·lules endotelials de cultius humans i inhibeix l'expressió gènica de quimiocines com l'interferó γ (IFN γ), la proteïna induïble per l'interferó 10 (IP-10) i la proteïna quimiotàctica α induïble per cèl·lules T (I-TAC) (Marx i col., 2000). L'activació de PPAR γ també inhibeix l'expressió de molècules d'adhesió pro-inflamatòries (VCAM-1, ICAM-1,

E-selectina) reduint l'adherència dels monòcits per activar les cèl·lules endotelials (Sasaki i col., 2005).

PPAR γ també regula la polarització M1/M2 dels macròfags. S'ha demostrat que els agonistes de PPAR γ són capaços d'inhibir l'activació de macròfags i suprimir el fenotip M1 i, en conseqüència, l'expressió de citocines pro-inflamatòries com TNF- α , IL-1 β i IL-6 (Jiang i col., 1998).

D'altra banda, l'activació de PPAR γ prevé la fosforilació de la subunitat p65 de NF- κ B (Sasaki i col., 2005) i de Stat-3 (Takata i col., 2002), evitant la translocació al nucli d'ambdós factors de transcripció involucrats en la resposta inflamatòria.

2. METABOLISME DELS ÀCIDS GRASSOS

Com s'ha comentat prèviament un dels processos regulats pels receptors nuclears PPAR és el metabolisme dels àcids grassos. Aquest procés és una font d'energia a llarg termini que és essencial pel manteniment del metabolisme cel·lular. En el cas dels animals, els àcids grassos que es metabolitzen, provenen principalment de dues fonts, de la dieta, on un 90% dels lípids són triglicèrids, o de la mobilització del greix emmagatzemat als adipòcits.

En una dieta equilibrada, l'energia aportada pels lípids no ha de ser superior al 30-35% del total de calories, de les quals, els àcids grassos saturats, no deuen aportar més del 10%. La composició d'àcids grassos (saturats, monoinsaturats i poliinsaturats) de la dieta, pot produir modificacions en els nivells de lipoproteïnes circulants i triglicèrids (Keys, 1965; Denke, 2006; Misra i col. 2010).

Al fetge, els àcids grassos poden ser oxidats, esterificats a lípids complexos com triacilglicèrids, fosfatidilcolines o fosfoetanolamines, o secretats al plasma en forma de triglicèrids units a VLDL. En una situació d'excés de consum energètic es pot desenvolupar una dislipèmia caracteritzada per una major secreció de VLDL al plasma.

A més de les alteracions en el perfil lipídic plasmàtic, un consum excessiu de greixos incrementa el risc de desenvolupar obesitat, intolerància a la glucosa i diabetis. S'ha demostrat que PPAR β/δ juga un paper important en el metabolisme dels àcids grassos i en el metabolisme de les lipoproteïnes. Així, l'administració d'agonistes de PPAR β/δ pot disminuir els nivells de triglicèrids plasmàtics (Oliver i col., 2001; Riséus i col, 2008) contribuint a la prevenció del síndrome metabòlic, però el seu mecanisme d'acció no és encara ben conegut.

2.1 Activació i transport dels àcids grassos a la matriu mitocondrial

L'aport energètic dels lípids prové de la β -oxidació del àcids grassos i té lloc majoritàriament a la matriu mitocondrial. El control d'aquest procés és clau pel manteniment energètic i prevenir el desenvolupament d'alteracions metabòliques.

Abans d'oxidar-se, els àcids grassos s'han d'activar per formar acil-CoA per mitjà d'una reacció catalitzada per una família d'acil-CoA sintases que es diferencien en la seva especificitat per la longitud de cadena de l'àcid gras i la seva localització subcel·lular (Zammit, 1984; Zammit i col. 2009). Aquests enzims es poden trobar associats a la membrana mitocondrial externa, als peroxisomes i al reticle endoplàsmic i catalitzen la formació d'un enllaç tioèster entre l'àcid gras i el coenzim A (Watkins, 1997).

La majoria d'àcids grassos es troben al citosol, on són sintetitzats o transportats des de l'exterior de la cèl·lula, però la seva oxidació es produeix a la matriu mitocondrial. Per poder entrar a la matriu mitocondrial, l'acil-CoA, que no pot travessar la membrana interna del mitocondri, reacciona amb carnitina a través de l'enzim CPT-I i forma acilcarnitina. Així, aquest derivat pot travessar la membrana interna del mitocondri per mitjà d'una proteïna transportadora anomenada CACT (acilcarnitina translocasa). Una vegada dins del mitocondri, l'acilcarnitina torna a donar carnitina i acil-CoA. Aquesta reacció es catalitza per la CPT-II localitzada a la membrana interna mitocondrial (Figura 8) (Zammit, 1999; Zammit i col. 2009).

L'enzim CPT-I és un punt clau en la regulació de la β -oxidació dels àcids grassos. Aquest enzim es troba fortament regulat pel seu inhibidor al·lostèric, el malonil-CoA (Ruderman i col., 1999). El malonil-CoA és el primer intermediari en la síntesi d'àcids grassos a partir d'acetil-CoA, un procés catalitzat per l'enzim acetil-CoA carboxilasa (ACC) i regulat per la relació insulina/glucagó (Bebertitz i Schuster, 2002). A més, com s'ha comentat anteriorment, l'enzim CPT-I es troba regulat transcripcionalment pel receptor nuclear PPAR α .

energia del metabolisme lipídic, de la que es podria obtenir d'una massa equivalent de glicogen (Bebernitz i Schuster, 2002). Es produeix principalment a la matriu mitocondrial, però també es pot realitzar als microsomes i peroxisomes (Zammit, 1999).

En la β -oxidació, l'acil-CoA és oxidat successivament al carboni β amb l'alliberament seqüencial de fragments de dos carbonis en forma d'acetil-CoA. L'oxidació completa d'un àcid gras de 16 carbonis, com el palmitat, produeix 8 acetil-CoA, 7 FADH₂ (dinucleòtid de flavina forma reduïda) i 7 NADH (dinucleòtid de nicotinamida adenina forma reduïda). Cada FADH₂ deriva cap a 2 ATP, cada NADH a 3 ATP i per cada acetil-CoA que es degradi al cicle de Krebs, es formen 12 ATP, produint-se un total de 131 ATP. Donat que el procés d'activació de l'àcid gras consumeix 2 ATP, una molècula de palmitat produeix un valor net de 129 ATP.

La β -oxidació consta de quatre reaccions recurrents, oxidació (deshidrogenació) dependent de FAD (dinucleòtid de flavina); hidratació; deshidrogenació dependent de NAD (dinucleòtid de nicotinamida adenina) i tiòlisi (Bebernitz i Schuster, 2002). Aquestes reaccions seqüencials són catalitzades per quatre grups d'enzims amb diferent localització intramitocondrial i/o especificitat segons la longitud de cadena (Yang i col., 2005). El primer pas, l'oxidació per FAD, és catalitzat per una acil-CoA deshidrogenasa (AD) formada per quatre subunitats idèntiques, cadascuna associada a un FAD. Existeixen quatre isoformes d'acil-CoA deshidrogenasa segons la longitud de la cadena de l'acetil-CoA: SCAD (*short chain AD*), MCAD (*medium chain AD*), LCAD (*long chain AD*) i VLCAD (*very long chain AD*) (Schulz, 1991; Izai i col., 1992). El dèficit de MCAD és un dels defectes congènits més freqüents que afecten al metabolisme dels àcids grassos (Andresen i col., 2001). L'expressió gènica d'aquest gen es troba regulada per PPAR α , sent també un punt clau en la regulació de la β -oxidació.

La resta de reaccions de la β -oxidació són catalitzades pels enzims EH (enoil-CoA hidratasa), HAD (3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa) i KT (3-cetotiolasa) (Bebernitz i Schuster, 2002).

Al fetge, l'acetil-CoA derivat de la β -oxidació, a més de subministrar energia en forma d'ATP, pot formar cossos cetònics com el β -hidroxibutirat i l'acetoacetat

INTRODUCCIÓ

mitjançant un procés anomenat cetogènesi (Laffel, 1999). Aquests cossos cetònics proveeixen d'energia a teixits perifèrics sent particularment importants pel cervell (Owen i col., 1967), permetent estalviar glucosa en les etapes tardanes de dejú. Els teixits perifèrics degraden els cossos cetònics al mitocondri fins acetil-CoA a través dels enzims succinil CoA:3-oxoàcid CoA-transferasa (SCOT) i metilacetoacetil CoA tiolasa (MAT) (Laffel, 1999). La β -oxidació d'àcids grassos és un component essencial en la via de síntesi de cossos cetònics ja que un augment en l'oxidació dels àcids grassos permet augmentar la cetogènesi hepàtica (Winder i Hardie, 1999; Thomson i Winder, 2009).

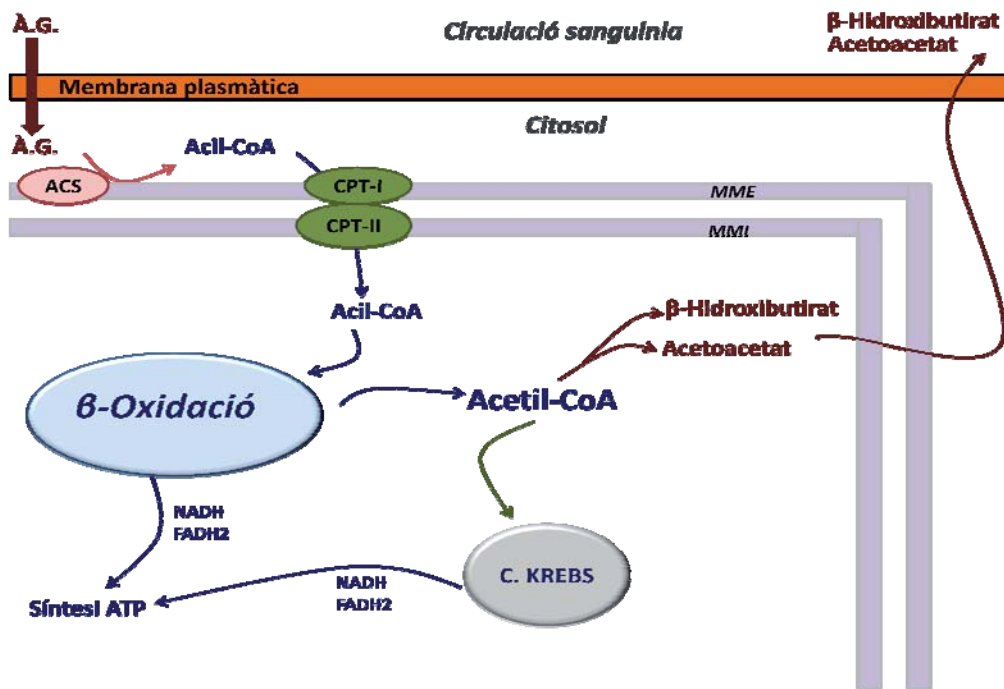


Figura 9. Esquema representatiu del catabolisme dels àcids grassos. À.G., Àcids grassos, CPT-I; carnitina palmitoil transferasa-I; CPT-II, carnitina palmitoil transferasa II; MME, matriu mitocondrial externa; MMI, matriu mitocondrial interna; NADH, dinucleòtid de nicotinamida adenina forma reduïda; FADH₂, dinucleòtid de flavina forma reduïda.

2.3 Regulació de la β -oxidació

La regulació de la β -oxidació depèn principalment de la disponibilitat de substrat de les cèl·lules. Aquesta disponibilitat es pot veure afectada segons l'alliberació dels àcids grassos dels triglicèrids per acció de la lipasa sensible a hormones (LSH) (Holm, 2003) i per la capacitat dels àcids grassos de travessar la membrana plasmàtica i la membrana mitocondrial (Thomson i Winder, 2009).

Les lipases localitzades al teixit adipós i al fetge es troben regulades hormonalment. Quan la relació glucagó/insulina augmenta, la lipasa es fosforila i s'activa per mitjà de la proteïna quinasa dependent d'AMPc, PKA (Watt i Steinberg, 2008). Així, en una situació de dejú o de resistència a la insulina, es produeix l'activació de les lipases per alliberar àcids grassos des del teixit adipós o emmagatzemats en el propi fetge per generar energia en la β -oxidació (Thomson i Winder, 2009).

Un punt important en el control de la β -oxidació és la regulació del transport d'acil-CoA per la membrana mitocondrial a través del sistema carnitina aciltransferasa. Quan els nivells de glucosa són abundants, augmenten els nivells de malonil-CoA per acció de l'ACC i s'inhibeix la CPT-I i el transport d'acil-CoA a l'interior del mitocondri (Bebernitz i Schuster, 2002). Així, el balanç energètic de la cèl·lula regula el catabolisme dels àcids grassos interrompent-se quan els nivells d'ATP són elevats.

2.3.1 AMPK

L'AMPK és un heterodímer format per tres subunitats, $\alpha 1/\alpha 2$, $\beta 1/\beta 2$ i $\gamma 1/\gamma 2/\gamma 3$, que, en general, regula els processos involucrats en la producció i utilització d'ATP (Hardie, 2004). L'AMPK es pot activar al·lostèricament per AMP, que facilita la seva fosforilació en el residu treonina. El sistema AMPK s'activa per qualsevol estrès cel·lular que incrementi la relació AMP/ATP com pot ser l'exercici físic, la deprivació de glucosa o la hipòxia (Towler i Hardie, 2007). Quan els nivells d'AMP són elevats, l'AMPK

INTRODUCCIÓ

es pot fosforilar al residu treonina 172 a través de proteïnes amb activitat AMPKK (AMPK quinasa) i s'inactiva per desfosforilació per la proteïna fosfatasa 2A, PP2A (Figura 10) (Bebernitz i Schuster, 2002).

Es coneixen tres proteïnes amb activitat AMPKK: LKB1, CaMKK β (*Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase β*) i TAK1 (*Transforming growth factor-activated kinase 1*). La LKB1 és l'AMPKK majoritària al fetge i la seva activitat pot ser regulada per acetilació a través de SIRT1 (Lan i col., 2008) com s'explicarà posteriorment. D'altra banda la CaMKK β fosforila i activa l'AMPK per un procés dependent de Ca²⁺ i independent d'AMP (Witczak i col., 2008).

En general, l'activació de l'AMPK activa les vies catabòliques que generen ATP, mentre inhibeix les vies anabòliques o qualsevol procés que consumeixi ATP. Així, l'AMPK és responsable de la regulació de l'activitat de l'ACC enzim que catalitza la formació de malonil-CoA inhibidor de la CPT-I (Munday i Hemingway, 1999; Bebernitz i Schuster, 2002). Aquesta ACC és present als teixits en dos isoformes, ACC1 o ACC α i ACC2 o ACC β . Al fetge, tot i que s'expressen ambdues isoformes amb una predominança de l'ACC1, és l'activitat de la isoforma ACC2 la que determina la regulació de les vies de síntesi o oxidació d'àcids grassos segons els nivells de malonil-CoA (Abu-Elheiga i col., 2001).

Així doncs, l'augment de la relació AMP/ATP produeix l'activació al·lostèrica de l'AMPK per AMP. L'AMPK fosforila i inhibeix l'ACC i altres enzims involucrats en el metabolisme energètic, com la LSH en teixit adipós i la hidroximetilglutaril-CoA reductasa (HMG-CoA reductasa), produint-se un descens de la síntesi d'àcids grassos, triglicèrids i esterols i, en conseqüència, l'augment de la β -oxidació i la cetogènesi al fetge (Winder i Hardie, 1999). A més d'inhibir l'ACC, l'AMPK pot activar per fosforilació l'enzim malonil-CoA descarboxilasa (MCD), que degrada el malonil-CoA formant de nou acetil-CoA (Saha i col., 2000).

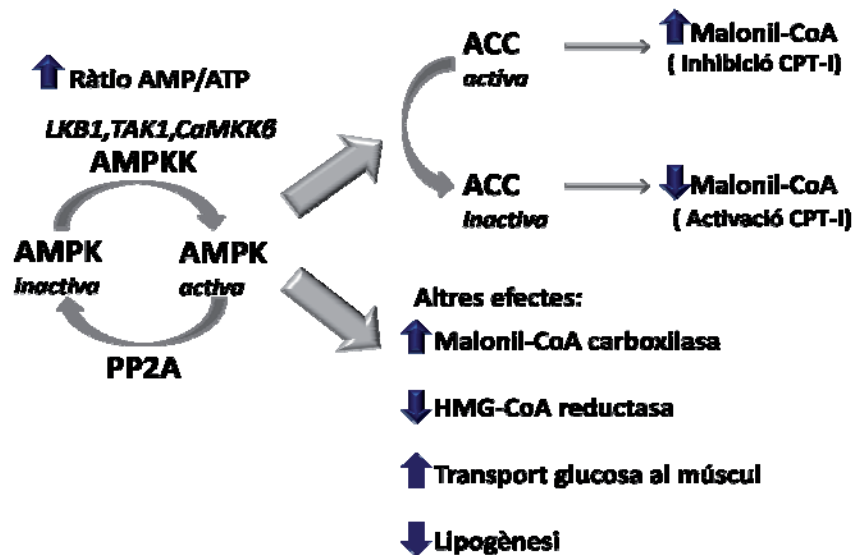


Figura 10. Esquema de l'activació de la proteïna quinasa activada per AMP (AMPK) i els seus efectes. AMPKK, AMPK quinasa; PP2A, proteïna fosfatasa 2A; ACC, acetil-CoA carboxilasa; CPT-I, carnitina palmitoil transferasa I; HMG-CoA reductasa, hidroximetilglutaril-CoA reductasa; AMP, adenina monofosfat; ATP, adenina trifosfat.

El fàrmac AICAR (5-aminoimidazol-4-carboxamida 1-β-D-ribonucleòsid) és un anàleg de l'AMP i s'ha demostrat que pot activar l'AMPK en adipòcits i hepatòcits. A més, a múscul esquelètic, l'administració d'AICAR, incrementa la β-oxidació dels àcids grassos d'igual forma que l'exercici físic, a més d'incrementar la captació de glucosa per augment en els nivells proteics i de translocació de Glut4 i augmentar l'hexoquinasa, primer enzim de la via glicolítica (Winder i col., 2000; Winder i Thomson, 2007). Així, induir l'activació de l'AMPK pot provocar canvis metabòlics com augmentar la captació de glucosa al múscul i altres teixits, disminuir la producció de glucosa al fetge i augmentar la β-oxidació dels àcids grassos, efectes que beneficiarien a pacients amb diabetis mellitus de tipus 2 o amb síndrome metabòlic.

Una altra via de regulació de l'AMPK és a través de l'ERK1/2 (*Extracellular signal-regulated kinase 1/2*). S'ha observat en estudis realitzats en fibroblats cardíacs la existència d'una inhibició recíproca entre ambdues proteïnes. Així, es va demostrar

INTRODUCCIÓ

que els factors de creixement cel·lular poden inhibir l'AMPK via ERK, però a més, l'activació de l'AMPK pot també inhibir la fosforilació d'ERK (Du i col., 2008).

Finalment, donat que aquets procés d'activació de l'AMPK és relativament transitori i no és suficient per mantenir els seus efectes a llarg termini, s'ha proposat la implicació d'altres factors que intervinguin. En aquest sentit, s'ha observat que en múscul esquelètic els efectes produïts per l'activació de l'AMPK es mantenen a llarg termini per l'activació de PPAR α i PGC-1 (Lee i col., 2006).

2.3.2 PGC1- α

El coactivador transcripcional PGC1- α es va identificar per primera vegada al teixit adipós marró per la seva interacció amb PPAR γ i la seva implicació a la termogènesi (Puigserver i col., 1998). Més tard, però, es va observar que PGC1- α s'expressava a la majoria de teixits amb gran capacitat oxidativa i que representava un paper important en la regulació de la funció mitocondrial i en el metabolisme energètic (Wu i col., 1999). De fet, s'ha proposat que aquest coactivador actua com un regulador pleiotròpic de múltiples vies relacionades amb el metabolisme energètic dintre i fora del mitocondri (Knutti i Kralli, 2001; Puigserver i Spiegelman, 2003), a més de poder activar diferents receptors nuclears, entre ells PPAR α , implicat en el control transcripcional de l'oxidació mitocondrial (Vega i col., 2000). En aquest sentit ha estat proposat que l'activació de la β -oxidació a llarg termini per l'AMPK es deu a un mecanisme que implica l'augment en l'expressió de PPAR α i PGC1- α (Lee i col., 2006). Així, l'administració d'AICAR, activador de l'AMPK, augmenta l'expressió gènica de PGC1 (Lee i col., 2006) i a la vegada coactiva PPAR α i regula la transcripció de gens implicats en l'oxidació dels àcids grassos al mitocondri, principalment CPT-I i MCAD (Vega i col., 2000).

2.3.3 Lipina 1

En els darrers anys s'ha proposat una nova via de regulació en el metabolisme lipídic a través de la proteïna lipina 1 (Finck i col., 2006; Reue, 2009). Aquesta proteïna pertany a una nova família de proteïnes que també inclou la lipina 2 i la lipina 3. Els gens d'aquestes tres proteïnes presenten una expressió tissular diferent, el que suggereix un diferent paper fisiològic (Reue, 2009). La lipina 1 s'expressa en alts nivells en el teixit adipós blanc, el múscul esquelètic i testicles però també es pot detectar a fetge, cervell, ronyó i cèl·lules β del pàncrees. La lipina 2 predomina al fetge i cervell i la lipina 3 és present a nivells baixos en molts teixits com l'intestí prim i el fetge (Reue, 2009).

La lipina 1 va ser identificada per primera vegada al 2001 en un model murí de lipodistròfia genètica. Aquests ratolins, anomenats fld (*fatty liver dystrophy*), presenten una mutació espontània al gen *Lpin1* responsable de la síntesi de la proteïna lipina 1 i mostren un fenotip que inclou esteatosi hepàtica, hipertrigliceridèmia, lipodistròfia i resistència a la insulina (Péterfy i col., 2001).

Recentment s'ha descobert que la lipina 1 pot exercir dos papers ben diferenciats en funció de la seva localització subcel·lular. Al citosol, la lipina 1 pot actuar com enzim PAP (*phosphatidate phosphatase*) intervenint en el penúltim pas de la síntesi de triglicèrids i fosfolípids, catalitzant el pas de fosfatidat a diacilglicerol (Reue, 2009). D'altra banda, al nucli, la lipina 1 pot actuar com a coactivador transcripcional interaccionant directament amb receptors nuclears com PPAR α i PGC1- α , activant així gens implicats en la fosforilació oxidativa mitocondrial i d'àcids grassos (Finck i col., 2006). Tanmateix, cal destacar que estudis amb rates sotmeses a exercici físic i tractades amb AICAR, mostren que l'activació de l'AMPK incrementa l'expressió de la lipina 1 i l'expressió de gens implicats en l'oxidació dels àcids grassos a múscul esquelètic (Higashida i col., 2008). Aquests resultats suggereixen que la lipina 1 podria ser activada per l'AMPK, fet que provocaria la seva interacció amb PGC1- α -PPAR α al nucli actuant com un amplificador selectiu de l'activació de gens relacionats amb l'oxidació dels àcids grassos, com la CPT-I i la MCAD (Figura 11) (Finck i col., 2006).

INTRODUCCIÓ

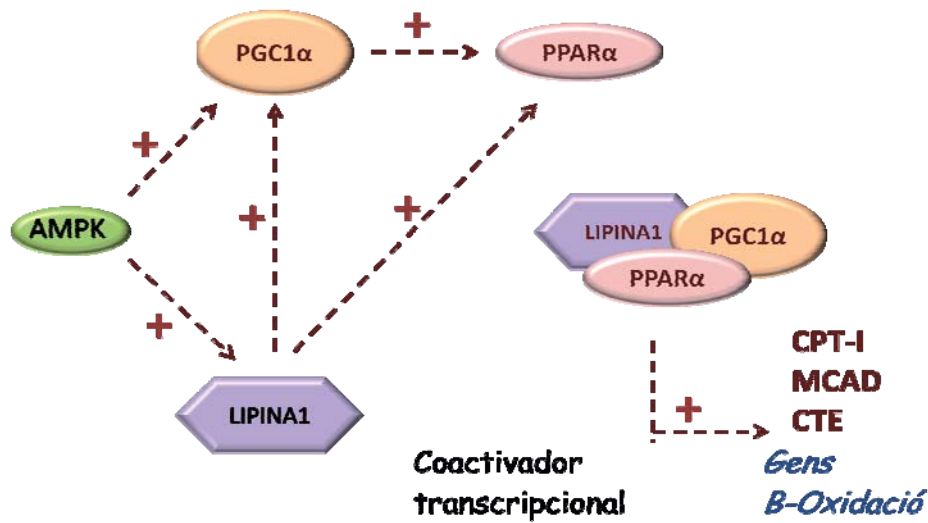


Figura 11. Representació esquemàtica de l'activació de la proteïna lipina 1 com a coactivador transcripcional per interacció directa amb PGC1- α i PPAR α .

2.3.4 SIRT1

En general, l'activació de l'AMPK manté les reserves d'energia cel·lular mitjançant l'activació de les vies catabòliques que produeixen ATP i inhibint les vies anabòliques. Aquesta regulació, però, pot ser coordinada conjuntament amb un altre sensor metabòlic, la desacetilasa dependent de NAD^+ ó SIRT1 (*Silent information regulator T1*).

Les sirtuïnes són un grup de desacetilases dependents de NAD^+ que es troben àmpliament distribuïdes a l'organisme i regulen una gran varietat de processos fisiològics com la inflamació, la senescència cel·lular, la proliferació i apoptosi cel·lular, la diferenciació, el metabolisme i el cicle cel·lular (Chung i col., 2010). A mamífers s'han identificat set enzims que pertanyen a aquest grup de proteïnes, SIRT1-SIRT7. D'aquest grup, l'enzim més ben estudiat és la sirtuïna 1 ó SIRT1 (Sir2 en llevats), responsable de regular diversos processos metabòlics i fisiològics involucrats en la patogènesi de la

diabetis, la inflamació i la malaltia neurodegenerativa i cardiovascular (Chung i col., 2010).

Les accions de SIRT1 són degudes a la seva capacitat de desacetilar histones i reguladors transcripcionals com el factor nuclear κ B (NF- κ B), FOXO (*forkhead box class O*), p53, PPAR γ i PGC1- α . Així, SIRT1 pot desacetilar i activar PGC1- α i FOXO1, incrementant l'expressió de gens involucrats en el metabolisme energètic, fet que suggereix que la seva activació podria ser una estratègia terapèutica efectiva contra malalties metabòliques i la diabetis mellitus de tipus 2 (Imai i Kiess, 2009).

La dependència de NAD⁺ com a cofactor associa SIRT1 a l'estat metabòlic de la cèl·lula. Així, l'activació de l'AMPK millora l'activitat de SIRT1 augmentant els nivells cel·lulars de NAD⁺, fet que produeix la desacetilació i regulació de molècules dianes de SIRT1 (Cantó i col., 2009).

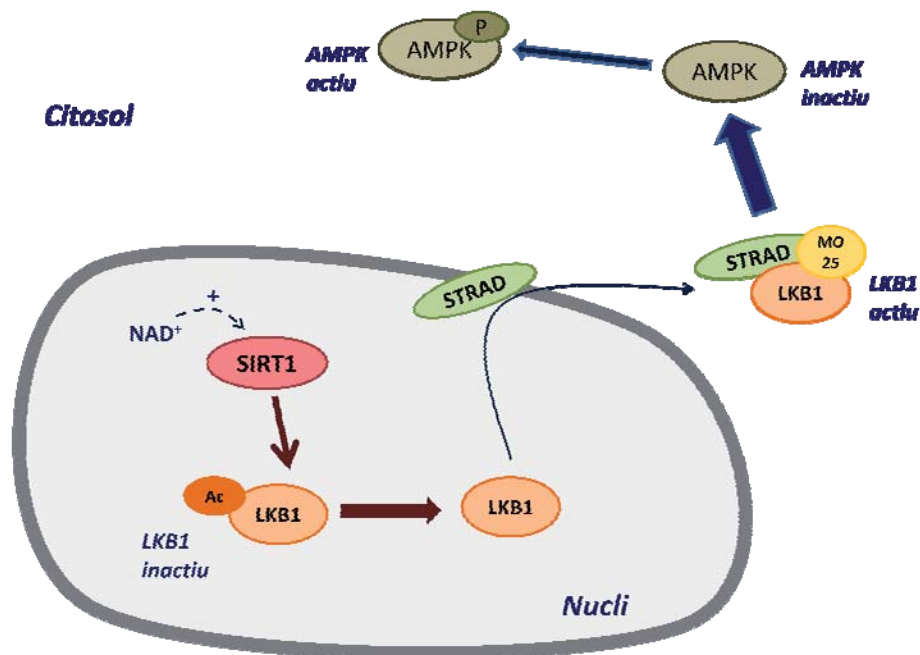


Figura 12. Mecanisme d'activació de LKB1 per desacetilació mitjançada per SIRT1. SIRT1, *Silent information regulator 1*; STRAD, *STE, related adapter*; MO25, *Mouse protein 25*

INTRODUCCIÓ

D'altra banda s'ha demostrat que la sobreexpressió de SIRT1 en hepatòcits mitjançant adenovirus també pot estimular l'activació de l'AMPK (Hou i col., 2008). Així, el silenciament de SIRT1 disminueix l'activitat basal de l'AMPK, fet que suggereix que l'activitat endògena de SIRT1 contribueix al manteniment de l'estat actiu de l'AMPK. En aquest cas, l'activació de l'AMPK per SIRT1 és mitjançada per LKB1 (Hou i col., 2008). Aquesta és l'AMPKK majoritària al fetge, on la seva deleció resulta en una total pèrdua d'activitat de l'AMPK (Shaw, 2005). Quan LKB1, que es localitza predominantment al nucli, és activada passa al citosol formant un complex amb STRAD (*STE-related adapter*) i MO25 (*Mouse protein 25*). La formació d'aquest complex permet incrementar la seva activitat quinasa per fosforilar i activar l'AMPK al residu Thr-172 (Figura 12) (Lan i col., 2008). Així doncs, SIRT1 disminueix l'acetilació de LKB1 i incrementa la seva activitat, fet que resulta en un increment de la fosforilació i l'activació de l'AMPK (Lan i col., 2008). Tenint en compte les funcions reguladores d'ambdues proteïnes, SIRT1 i AMPK, la regulació de la via SIRT1/LKB1/AMPK pot esdevenir una bona diana terapèutica pel tractament, tant de malalties metabòliques i diabetis, com de malalties relacionades amb l'envelliment.

3. EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓ PRO-INFLAMATORI NF- κ B

A més dels efectes dels PPARs sobre el metabolisme, nombroses evidències suggereixen que aquests receptors nuclears són importants reguladors del sistema immune. A models animals, la utilització de lligands de PPAR, ha mostrat una important activitat antiinflamatòria, fet que indica la seva possible utilització en tractaments antiinflamatoris i contra malalties autoimmunes ens humans.

La falta de lligands específics de PPAR β/δ ha fet que els seus efectes davant la resposta inflamatòria hagin estat menys estudiats en comparació amb els subtipus de PPAR, PPAR α i PPAR γ . Tot i així, s'ha demostrat que la utilització d'agonistes de PPAR β/δ presenta un efecte terapèutic en el model experimental d'encefalomielitis autoimmune (Straus i col., 2007). A més, en ratolins *knock-out* per a PPAR β/δ s'ha demostrat que la deficiència d'aquest receptor nuclear està relacionat amb l'alteració de la resposta inflamatòria a la pell (Barish i col., 2006; Peters i col., 2000). Un altre factor que sembla recolzar un important paper de PPAR β/δ a la pell és el fet d'ésser el subtipus predominant dels tres PPARs (Westergaard i col., 2003). Tot això podria explicar l'interés de la utilització d'agonistes de PPARs, en especial de PPAR β/δ , pel tractament de diversos trastorns epidèrmics, en particular els que es caracteritzen per la presència d'inflamació, hiperproliferació de queratinòcits i diferenciació aberrant, tal com és el cas de la psoriasi (Michalik i Wahli, 2007).

3.1 NF- κ B

NF- κ B és un factor de transcripció d'expressió ubiqua responsable de la regulació de la resposta immune i inflamatòria. Nombroses evidències indiquen que NF- κ B juga un paper fonamental en la biologia de l'epidermis (Kaufman i Fuchs, 2000). Així, a malalties inflamatòries de la pell com la psoriasi i la dermatitis atòpica, els queratinòcits poden produir i respondre a mediadors inflamatoris com citocines i quimiocines a través de l'activació d'aquest factor de transcripció (Tan i col., 2001).

INTRODUCCIÓ

Alguns dels gens implicats en la resposta inflamatòria de la pell induïts per NF- κ B són TSLP (*Thymic stromal lymphopoietin*), TNF- α , IL8, IL12, IFN α i IFN β (Wang i col., 2009).

La inhibició de NF- κ B és un dels efectes antiinflamatoris que presenta PPAR β/δ , però el seu mecanisme d'acció encara no és ben conegut. L'activació de PPAR β/δ pot inhibir l'activació de NF- κ B en cèl·lules endotelials (Rival i col., 2002), cardiomiòcits (Smeets i col., 2008) i adipòcits (Rodríguez-Calvo, 2008). A adipòcits la inhibició de NF- κ B és mitjançada per la inhibició de la fosforilació de la proteïna MAP quinasa ERK1/2 (Rodríguez-Calvo, 2008).

A mamífers es coneixen cinc membres de la família NF- κ B: p50 (NF- κ B1), p52 (NF- κ B2), p65 (Rel A), c-Rel i c-RelB. Aquestes proteïnes es caracteritzen per la presència d'un domini d'homologia Rel (RHD) que permet la seva dimerització, la unió a l'ADN i la interacció amb la molècula inhibidora I κ B. La forma més abundant de NF- κ B és l'heterodímer p50/p65 on p65 conté el domini de transactivació (Kiernan i col., 2003).

NF- κ B s'expressa de manera constitutiva a les cèl·lules però l'activitat de NF- κ B es troba regulada per la seva localització subcel·lular. En condicions basals, NF- κ B es troba inactiu al citoplasma segrestat pel seu inhibidor I κ B (Kiernan i col., 2003). Quan es produeix un estímul, NF- κ B s'allibera dels seus inhibidors permetent la seva translocació al nucli on és transcripcionalment actiu.

A excepció de RelB, totes les proteïnes NF- κ B contenen un lloc de fosforilació per la PKA que és clau per la translocació d'aquest factor de transcripció. Altres llocs de fosforilació importants per la transactivació són els de la proteïna quinasa C zeta (PKC ζ), la caseïna quinasa II (CKII) i la IKK α/β (Majdalawieh i Ro, 2010).

3.1.1 IκB

La família IκB inclou Iκ α , IκB β , IκB γ , IκB ϵ , Bcl-3, el precursor de NF-κB1, p105 i el precursor de NF-κB2 p100, dels quals IκB α és el membre més estudiat. En general, són proteïnes que s'expressen de manera constitutiva i es localitzen al citosol. Es caracteritzen per presentar sis o set motius anquirina, que són motius de 33 aminoàcids repetits en tàndem que permeten la interacció proteïna-proteïna (Majdalawieh i Ro, 2010).

La principal funció de les proteïnes IκB és inhibir l'activitat de NF-κB. Per dur a terme aquesta acció, les IκB interaccionen a través dels motius anquirina amb l'heterodímer NF-κB pel domini RHD i interfereixen amb les seqüències de localització nuclear (NLSs) que permeten la seva translocació al nucli (Baldwin, 1996). D'aquesta forma, NF-κB es manté segregat al citosol i s'inhibeix la seva translocació al nucli (Majdalawieh i Ro, 2010).

Quan es produeix un estímul, IκB α és fosforilat i es produeix la seva ubiquitinització i degradació. La fosforilació d'IκB α és catalitzada pel complex IκB quinasa (IKK), format per IKK α , IKK β i IKK γ , aquest últim també anomenat NEMO (Ghosh i Karin, 2002). Aquesta fosforilació permet la unió d'ubiquitina a IκB α i, en conseqüència, la seva degradació al proteasoma 26S. D'aquesta forma, NF-κB queda lliure per translocar al nucli i poder unir-se als llocs κB dels seus gens diana (Figura 13) (Pahl, 1999).

D'altra banda, NF-κB pot regular per si mateix l'expressió dels inhibidors IκB. Quan NF-κB indueix els seus gens diana, indueix també l'expressió de IκB sintetitzant ràpidament nova proteïna IκB α . D'aquesta manera es produeix una activació controlada i transitòria dels gens diana de NF-κB (Baldwin, 1996).

INTRODUCCIÓ

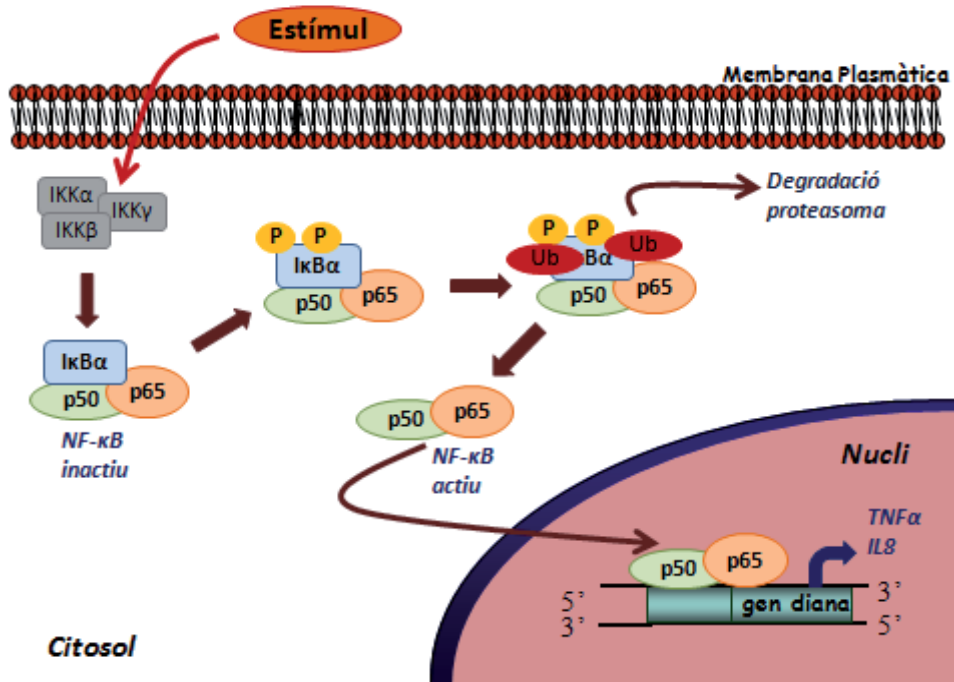


Figura 13. Esquema de l'activació de NF-κB. Quan es produeix un estímul el complex IKK fosforila IκBα, permetent la seva ubiquitinització i degradació. Un cop NF-κB ha estat activat es transloca al nucli on serà modificat per adquirir la seva activitat transcripcional màxima.

La primera etapa en l'activació de NF-κB es desenvolupa al citoplasma i termina amb la seva translocació al nucli. Tot i així, per poder adquirir la seva capacitat màxima com factor transcripcional, la subunitat p65 de NF-κB ha de ser fosforilada i acetilada.

3.2 HSP27

L'Hsp 27 és una proteïna membre de la família de les Hsp (*Heat-shock protein*) que actua com una proteïna xaperona i protegeix les cèl·lules contra l'estrès ambiental (Lanneau i col. 2010). Aquesta proteïna s'expressa a l'epidermis de pell humana i juga un paper important en la diferenciació i apoptosi de queratinòcits. Estudis recents

però, mostren també la seva implicació en la regulació de la resposta inflamatòria de la pell (Sur i col., 2008). De fet, pacients amb psoriasi o dermatitis atòpica presenten un augment en l'expressió d'Hsp27 en comparació amb pacients sans com regulador de la producció de mediadors pro-inflamatoris (Sur i col., 2010). Als queratinòcits, Hsp27 es pot associar al complex IKK, evitant la fosforilació i la conseqüent degradació de I κ B α , tot regulant l'activitat NF- κ B (Sur i col., 2010). A més, estudis amb queratinòcits estimulats amb TNF- α i radiacions UV mostren que la inhibició de Hsp27 augmenta l'alliberament de citoquines pro-inflamatòries i que aquest increment es reverteix amb un pretractament amb l'inhibidor de NF- κ B BAY11-7082 (Sur i col., 2010).

3.3 Regulació per acetilació/desacetilació de l'activitat NF- κ B

L'activitat de NF- κ B es pot regular per modificacions covalents que alteren l'habilitat dels dímers de NF- κ B per unir-se a l'ADN, reclutar coactivadors a la regió promotora i interactuar amb I κ B.

Recentment s'ha demostrat que l'acetilació és un important mecanisme regulador de diversos processos fisiològics. Al fetge per exemple, com s'ha comentat anteriorment, l'activitat de l'AMPK es pot regular per l'estat d'acetilació de la proteïna LKB1. En el procés inflamatori l'activitat de NF- κ B també pot ser regulada al nucli per acetilació/desacetilació. En concret, l'activitat de NF- κ B es pot regular per l'acetilació de la subunitat p65 a través de la interacció de NF- κ B amb el coactivador CBP (*cyclic AMP response element binding protein, [CREB]-binding protein*) i el seu homòleg p300 (Figura14) (Hayden i Ghosh, 2007).

Per poder produir-se la translocació al nucli, NF- κ B ha de ser fosforilat a la serina 276 per la proteïna PKA (Proteïna quinasa A) (Figura14) (Hayden i Ghosh, 2007).

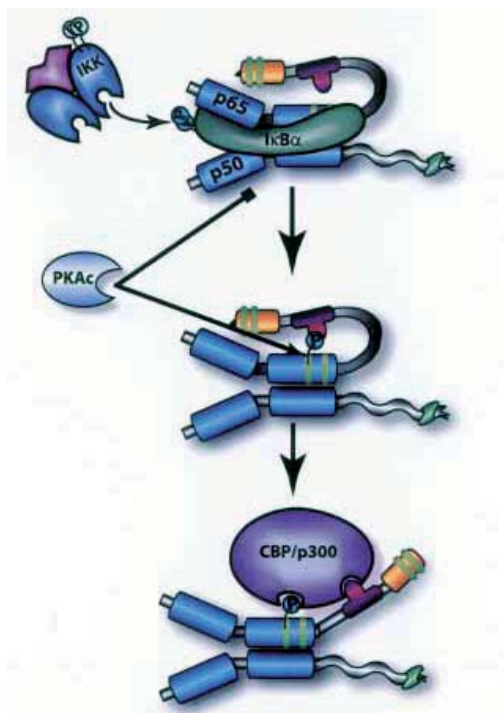


Figura 14. Esquema de la fosforilació de NF-κB a través de la PKA. La fosforilació permet la translocació del factor de transcripció al nucli i la seva interacció amb el coactivador CBP/p300. *Hayden i Ghosh. (2004)*

3.3.1 CBP/p300

Al nucli, NF-κB interacciona físicament amb CBP i p300, dos enzims amb activitat HAT (histona acetil transferasa) que acetilen la subunitat p65 a múltiples lisines (lisines 122, 123, 218, 221 i 310) (Chen i Green, 2003). Com a conseqüència de l'acetilació de p65, concretament de les lisines 221 i 310, NF-κB s'uneix a l'element κB per activar la transcripció i disminueix la interacció amb IκB de nova síntesi (Chen i Green., 2003). De fet, s'ha demostrat que l'acetilació de la Lys 310 és clau per l'activitat de NF-κB, ja que la inhibició de la seva acetilació, mutacions de la Lys 310 per arginina o la inducció de la seva desacetilació, inhibeixen significativament la transactivació de NF-κB (Yang i col., 2010). Tant CBP com p300 poden acetilar NF-κB, però estudis de Chen i Green. (2003) han demostrat que l'activitat de p300 és essencial

perquè es produeixi aquesta modificació. De fet, mutacions al domini acetil transferasa en p300 eviten l'acetilació de p65 a la Lys 310 induïda per TNF- α (Chen i Green, 2003 i 2005).

D'altra banda l'activitat de p300 pot ser regulada per fosforilació a través de l'AMPK. De fet, la fosforilació de p300 al residu serina 89 per aquesta quinasa bloqueja selectivament la interacció de p300 amb receptors nuclears i factors de transcripció com NF- κ B (Yang i col., 2010).

3.3.2 SIRT1

L'acetilació de NF- κ B també pot ser regulada per un grup de desacetilases d'histones anomenades HDCA1, HDCA2 i HDCA3 que desacetilen NF- κ B, disminuint la seva activitat i sent exportat del nucli per unió a I κ B (Ghosh i col., 2007). S'ha observat però, que SIRT1 juga també un paper important en la regulació de NF- κ B per desacetilació de la subunitat p65 (Yeung i col., 2004).

Com s'ha comentat anteriorment, SIRT1 és una desacetilasa dependent de NAD⁺ que es troba àmpliament distribuïda per l'organisme i regula una gran varietat de processos fisiològics, entre ells la inflamació. Estudis amb resveratrol, un potent agonista de l'activitat de sirtuïnes, han demostrat la inhibició de NF- κ B a través de la desacetilació de p65 al residu Lys 310 (Figura 15) (Yeung i col., 2004). A més d'ésser acetilat, p65 també pot ser metilat a les lisines 314 i 315 per l'enzim lisina metiltransferasa Set9 (Yang i col., 2010). La metilació d'aquests dos residus regula negativament les funcions de NF- κ B provocant la seva ubiquitinització i degradació. En resum, la desacetilació de la Lys 310 per SIRT1 permet la metilació de p65 i la degradació de NF- κ B (Yang i col., 2010).

OBJECTIUS

Els PPARs juguen un paper fonamental en diversos processos fisiològics, destacant la seva importància en la regulació del metabolisme i de la resposta inflamatòria. En concret, la utilització dels agonistes del subtipus PPAR β/δ ha estat proposada com a una nova estratègia terapèutica per tractar les dislipèmies i les patologies amb una base inflamatòria. L'objectiu general d'aquesta Tesi Doctoral ha estat estudiar nous mecanismes pels quals l'activació de PPAR β/δ regula el metabolisme lipídic hepàtic dels àcids grassos i la resposta inflamatòria en queratinòcits. Més concretament, els objectius específics d'aquest treball han estat el següents:

- I. Establir els mecanismes responsables de l'efecte hipotrigliceremiant de l'agonista de PPAR β/δ GW501516 en ratolins alimentats amb una dieta rica en greixos (HFD).

- II. Establir els mecanismes responsables pels quals l'activador de PPAR β/δ GW501516 és capaç d'inhibir la resposta inflamatòria en queratinòcits humans estimulats amb TNF- α .

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Publicació 1

PPAR β/δ activation prevents the downregulation of AMPK, Lipin1 and PGC1 α caused by a high-fat diet in liver and amplifies the PPAR α pathway leading to increased fatty acid oxidation

Emma Barroso, Ricardo Rodríguez-Calvo, Lucía Serrano-Marco, Alma M. Astudillo, Jesús Balsinde, Xavier Palomer i Manuel Vázquez-Carrera

En avaluació

La ingesta excessiva de calories i la gran disponibilitat de nutrients han permès la contínua progressió de la incidència de l'obesitat i la resistència a la insulina. Aquests factors són els principals responsables del desenvolupament del síndrome metabòlic, que es caracteritza per la presència d'una dislipèmia que s'inicia amb la sobreproducció hepàtica de lipoproteïnes VLDL que transporten triglicèrids, seguida de l'aparició de partícules LDL més petites i denses i d'una reducció en els nivells de colesterol HDL i hiperlipèmia postprandial. Totes aquestes alteracions constitueixen la dislipèmia aterogènica en un factor de risc molt important per la malaltia cardiovascular i coronària, fet pel qual és molt important buscar nous tractaments que previnguin el seu desenvolupament.

Entre els nous tractaments farmacològics s'ha proposat la utilització del subtipus PPAR β/δ com a nova diana terapèutica per prevenir l'augment de triglicèrids plasmàtics i el desenvolupament del síndrome metabòlic. Entre altres efectes, el tractament amb el lligand PPAR β/δ d'alta afinitat GW501516 ha demostrat la seva eficàcia per reduir els triglicèrids plasmàtics, encara que els mecanismes responsables dels efectes hipotrigliceremiants no són ben coneguts.

Un factor determinant en la secreció de triglicèrids és la disponibilitat hepàtica d'àcids grassos. Al fetge, els àcids grassos poden ser incorporats a triglicèrids o bé oxidats al mitocondri pel procés de β -oxidació. Per tant, millorar la β -oxidació al fetge podria reduir la disponibilitat d'àcids grassos i, en conseqüència, la secreció hepàtica de triglicèrids. Actualment es desconeix però, si l'efecte hipotrigliceremiant observat per l'activació de PPAR β/δ inclou un increment de la β -oxidació dels àcids grassos i els mecanismes implicats.

L'objectiu d'aquest estudi ha estat avaluar els efectes de l'activador de PPAR β/δ GW501516 sobre la hipertrigliceridèmia induïda per una dieta rica en greixos (HFD, de l'anglès, *high fat diet*) i els seus efectes sobre la β -oxidació hepàtica. Els resultats obtinguts mostren que l'exposició a la HFD produeix hipertrigliceridèmia acompanyada d'una reducció dels nivells hepàtics de la proteïna AMPK fosforilada, implicada en l'activació de la β -oxidació. A més d'aquesta disminució dels nivells de la pAMPK, es va observar un increment dels nivells de l'ERK1/2 fosforilada.

RESULTATS

L'administració de GW501516 va restaurar els nivells d'ambdues proteïnes, AMPK i ERK1/2, i va induir la β -oxidació hepàtica a través d'un mecanisme que implica l'activació del sistema Lipina 1/PGC1- α -PPAR α . Aquests resultats proposen un nou mecanisme d'acció pel qual l'activació de PPAR β/δ pot contribuir a revertir la hipertrigliceridèmia causada per la HFD i apunta a l'AMPK, PGC1- α i Lipina 1 com dianes farmacològiques per la prevenció d'aquesta dislipèmia.

PPAR β/δ activation prevents the downregulation of AMPK caused by a high-fat diet in liver and amplifies the PGC-1 α -lipin 1-PPAR α pathway leading to increased fatty acid oxidation

Emma Barroso^{1,2}, Ricardo Rodríguez-Calvo^{1,2}, Lucía Serrano-Marco^{1,2}, Alma M. Astudillo^{2,3},
Jesús Balsinde^{2,3}, Xavier Palomer^{1,2} and Manuel Vázquez-Carrera^{1,2}

¹Department of Pharmacology and Therapeutic Chemistry, and Institut de Biomedicina de la UB (IBUB), Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona, Spain, ²CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM)-Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Spain, ³Instituto de Biología y Genética Molecular, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Valladolid, Spain.

Abbreviated title: PPAR β/δ activation amplifies the PGC-1 α -lipin 1-PPAR α pathway

Corresponding author: Manuel Vázquez-Carrera. Unitat de Farmacologia. Facultat de Farmàcia. Diagonal 643. E-08028 Barcelona. Spain. Phone 93 4024531. Fax 93 4035982. E-mail: mvazquezcarrera@ub.edu

Abbreviations: AMPK, AMP-activated protein kinase; Aprt, adenosyl phosphoribosyl transferase; Cept1, cholineethanolamine phosphotransferase-1; CPT1a, liver carnitine palmitoyltransferase-1; CTE, cytosolic thioesterase; ERK1/2, extracellular-signal-regulated kinase 1/2; HFD, high-fat diet; MCAD, medium chain acyl-coA dehydrogenase; PGC-1 α , PPAR γ -coactivator 1 α ; PAP-1, phosphatidic acid phosphatase-1; PPAR, Peroxisome Proliferator-Activated Receptor; SIRT1, silent information regulator T1; VLDL, very low-density lipoproteins.

Abstract

Metabolic syndrome-associated dyslipidemia is mainly initiated by hepatic overproduction of the plasma lipoproteins carrying triglycerides. Here we examined the effects of the PPAR β/δ activator GW501516 on high-fat diet (HFD)-induced hypertriglyceridemia and hepatic fatty acid oxidation. Exposure to the HFD caused hypertriglyceridemia that was accompanied by reduced hepatic mRNA levels of PGC-1 α and lipin 1 and these effects were prevented by GW501516 treatment. GW501516 treatment also increased nuclear lipin 1 protein levels, leading to amplification in the PGC-1 α -PPAR α signaling system, as demonstrated by the increase in PPAR α levels and PPAR α -DNA binding activity and the increased expression of PPAR α -target genes involved in fatty acid oxidation. These effects of GW501516 were accompanied by an increase in plasma β -hydroxybutyrate levels, demonstrating enhanced hepatic fatty acid oxidation. Moreover, GW501516 increased the levels of the hepatic endogenous ligand for PPAR α , 16:0/18:1-phosphatidilcholine, and markedly enhanced the expression of the hepatic *Vldl receptor*. Interestingly, GW501516 prevented the reduction in AMPK phosphorylation and the increase in phosphorylated levels of ERK1/2 caused by HFD. In addition, our data indicate that the activation of AMPK after GW501516 treatment in mice fed HFD might be the result of an increase in the AMP/ATP ratio in hepatocytes. These findings indicate that the hypotriglyceridemic effect of GW501516 in HFD-fed mice is accompanied by an increase in phospho-AMPK levels and the amplification of the PGC-1 α -Lipin 1-PPAR α pathway.

Supplementary key words HFD, MCAD, ERK1/2.

Introduction

Excess caloric intake and nutrient availability have increased the incidence of obesity and insulin resistance, which are the main factors responsible for the development of metabolic syndrome. This condition is characterized by dyslipidemia, which is a major risk factor for cardiovascular disease, and predisposes to early atherosclerosis and cardiovascular morbidity (1). Dyslipidemia in metabolic syndrome is characterized by high levels of plasma triglycerides, low levels of high-density lipoprotein cholesterol and the appearance of small, dense, low-density lipoproteins and excessive postprandial lipemia (2). It is now recognized that the dyslipidemia associated with the metabolic syndrome is mainly initiated by the hepatic overproduction of the plasma lipoproteins carrying triglycerides, the very low-density lipoproteins (VLDL), which induce a sequence of lipoprotein changes leading to atherogenic lipid abnormalities in metabolic syndrome (3). It is thus important to find new pharmacological treatments to reduce plasma triglyceride levels and thus prevent the development of atherogenic dyslipidemia in metabolic syndrome. Among the new pharmacological treatments to prevent the increase in triglyceride levels, Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPAR) β/δ activators have attracted widespread attention. PPARs are members of the nuclear receptor superfamily of ligand-activated transcription factors that regulate the expression of genes involved in many important biological processes (4). The PPAR family consists of three members, PPAR α (NR1C1 according to the unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily), PPAR β/δ (NR1C2) and PPAR γ (NR1C3) (5). PPAR α was the first to be identified and was demonstrated to be the molecular target of the fibrate hypolipidemic class of drugs. This PPAR isotype is expressed primarily in tissues that have a high level of fatty acid catabolism such as liver, brown fat, kidney, heart and skeletal muscle (6). PPAR γ has a restricted pattern of expression, mainly in white and brown adipose tissues and colon and it is also expressed in macrophages, whereas other tissues such as skeletal muscle and heart contain limited amounts. PPAR β/δ is expressed ubiquitously, including metabolically active tissues such as liver, muscle and fat, and its role in the metabolic syndrome has been elucidated in the last

RESULTATS

years (7-9). Among other effects, treatment with the high affinity PPAR β/δ ligand GW501516 has been shown to decrease triglycerides (10). In PPAR β/δ -null mice the hypotriglyceridemic effect of PPAR β/δ has been associated with its effect on hepatic VLDL production and clearance (11), but the contribution of additional mechanisms has not been explored. Interestingly, the main factor influencing hepatic triglyceride secretion is fatty acid availability (12). In liver, fatty acids are either incorporated into triglycerides or oxidized by mitochondrial β -oxidation. An increase in fatty acid oxidation in liver would thus reduce the availability of fatty acids and subsequent hepatic triglyceride secretion. However, it is unknown whether the hypotriglyceridemic effect observed following PPAR β/δ activation involves increased hepatic fatty acid oxidation and the mechanisms involved. The rate-limiting step for mitochondrial β -oxidation is the transport of fatty acid into mitochondria by liver carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT1a). This fatty acid transporter is under the control of both PPARs and AMP-activated protein kinase (AMPK), which detects low ATP levels and in turn increases oxidative metabolism (13) by reducing the levels of malonyl-CoA. Interestingly, PPAR β/δ activation can increase the activity of AMPK and the increase in fatty acid oxidation in human skeletal muscle cells following GW501516 treatment is dependent on both PPAR β/δ and AMPK (14). A novel protein, Lipin 1, determines whether fatty acids are incorporated into triglycerides or undergo mitochondrial β -oxidation. The expression and compartmentalization of lipin 1 controls the secretion of hepatic triglycerides (15). Thus, in the cytoplasm, lipin 1 promotes triglyceride accumulation and phospholipid synthesis by functioning as an Mg²⁺-dependent phosphatidate phosphatase (phosphatidic acid phosphatase-1, PAP-1). In contrast, in the nucleus lipin 1 acts as a transcriptional co-activator linked to fatty acid oxidation by regulating the induction of PGC-1 α -PPAR α -target genes (16). Lipin 1 induces PPAR α gene expression and forms a complex with PPAR α and PGC-1 α leading to the induction of genes involved in fatty acid oxidation, including *Cpt1a* and *Mcad* (*medium chain acyl-coA dehydrogenase*) (16).

Here we examine the effects of the PPAR β/δ activator GW501516 on the hypertriglyceridemia induced by a high-fat diet (HFD) and on the hepatic fatty acid oxidation pathway. Exposure to

HFD caused hypertriglyceridemia accompanied by reduced hepatic phospho-AMPK levels and increased activity of extracellular-signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2). Interestingly, drug treatment reduced hypertriglyceridemia, restored hepatic phosphorylated levels of AMPK and ERK1/2, and induced liver fatty acid oxidation through a mechanism involving increased activation of the Lipin 1/PGC-1 α -PPAR α signaling system. The findings of this study indicate a new mechanism of action by which PPAR β/δ may contribute to the reversal of hypertriglyceridemia caused by HFD, and point to hepatic AMPK, PGC-1 α and Lipin 1 as pharmacological targets to prevent this dyslipidemia.

Materials and Methods

Materials

GW501516 was provided by Alexis Biochemicals (Lausen, Switzerland). [γ -³²P]dATP (3000 Ci/mmol) was purchased from Amersham Biosciences (Piscataway, NJ). All other chemicals were from Sigma-Aldrich.

Animals

Mice aged 5 weeks were maintained under standard conditions of illumination (12-h light/dark cycle) and temperature ($21 \pm 1^\circ\text{C}$). They were fed a standard diet (Harlan, Barcelona, Spain) for five days before the study began. The animals were then randomly distributed into three experimental groups (n=12 each): those fed the standard diet, those fed a Western-type high-fat diet (HFD, 35% fat by weight, 58% Kcal from fat, Harlan Ibérica S.A., Barcelona, Spain) plus one daily oral gavage of vehicle (0.5% w/v carboxymethylcellulose medium viscosity), and those fed on HFD plus one daily oral dose of 3 mg/kg/day of the PPAR β/δ agonist GW501516 dissolved in the vehicle. Before the end of the treatments, a glucose tolerance test was performed on mice fasted for 4h. Animals received 2 g/Kg body weight of glucose by intraperitoneal injection and blood was collected from the tail vein after 0, 20, 40 and 90 minutes. The body weight of the mice and the food intake were checked regularly during the treatment period. After 3 weeks of treatment, mice were killed under isoflurane anesthesia. After collecting blood, serum samples

RESULTATS

were analysed for triglycerides, glucose (Bayer Iberia, Sant Joan Despí, Spain), cholesterol, free fatty acids (Wako, Japan), insulin (Amersham), adiponectin and leptin (Linco, St. Charles, MO). The liver samples were frozen in liquid nitrogen and then stored at -80°C. These experiments conform to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). All procedures were approved by the University of Barcelona Bioethics Committee, as stated in Law 5/21 July 1995 passed by the Generalitat de Catalunya (Autonomous Govern of Catalonia).

Measurements of mRNA

Levels of mRNA were assessed by the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) as previously described (17). The sequences of the sense and antisense primers used for amplification were: Lipin 1, 5'-CTGCAGACAGGTTGACGCCAA-3' and 5'-TCTGGTGGATGAGCAGTCCCC-3'; Pgc-1 α , 5'-CCCGTGGATGAAGACGGATTG-3' and 5'-GTGGGTGTGGTTTGCTGCATG-3'; Ppara α , 5'-GGCTCGGAGGGCTCTGTCATC-3' and 5'-ACATGCACTGGCAGCAGTGGA-3'; Cpt1a, 5'-TATGTGAGGATGCTGCTT-3' and 5'-CTCGGAGAGCTAAGCTTG-3'; Mcad, 5'-TGGAAAGCGGCTCACAAGCAG-3' and 5'-CACCGCAGCTTTCCGGAATGT-3'; cytosolic thioesterase (Cte) 5'-CAGCCACCCCGAGGTAAAAGG-3' and 5'-CCTTGAGGCCATCCTTGGTCA-3'; cholineethanolamine phosphotransferase-1 (Cept1) 5'-GCTAGGTGAGCCGCTCAGTGC-3' and 5'-ATGGTGCCTCCTCCGTGACTG-3'; Vldl receptor (Vldl-r) 5'-GTTCAAGTGCAGAAGCGGGGA-3' and 5'-CCGGGTTTTGGCATTCAATCAA-3'; and adenosyl phosphoribosyl transferase (Aprt), 5'-AGCTTCCCGGACTTCCCCATC-3' and 5'-GACCACTTTCTGCCCCGGTTC-3'. Amplification of each gene yielded a single band of the expected size (Lipin 1: 225 bp, Pgc-1 α : 228 bp, Ppara α : 654 bp, Cpt-1a: 629 bp, Mcad: 216 bp, Cte: 244 bp, Cept1: 233 bp, Vldl-r: 227 bp, and Aprt: 329 bp). Preliminary experiments were carried out with various amounts of cDNA to determine non-saturating conditions of PCR amplification for all the genes studied. Therefore, under these conditions, relative quantification of mRNA was assessed by the RT-PCR method used in this study (18). Radioactive bands were quantified by video-densitometric scanning (Vilber Lourmat

Imaging, France). The results for the expression of specific mRNAs are presented relative to the expression of the control gene (Apt).

Isolation of nuclear extracts- Nuclear extracts were isolated as previously described (17).

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)- EMSA was performed using double-stranded oligonucleotides for the consensus binding site of PPAR (PPRE probe; 5'-CAAAGTAAAGTCAAAGGTCA-3', Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) as previously described (19).

Immunoblotting

To obtain total protein, livers were homogenized in cold lysis buffer (5 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM sodium orthovanadate, 5.4 µg/ml aprotinin). The homogenate was centrifuged at 16,700 x *g* for 30 min at 4°C. Protein concentration was measured by the Bradford method. Protein extracts were resolved by SDS-PAGE on 10% separation gels and transferred to Immobilon polyvinylidene difluoride membranes (Millipore, Bedford, MA). Western blot analysis was performed using antibodies against total AMPK, phospho-Thr¹⁷²-AMPK, total ERK1/2, phospho-ERK1/2, the catalytic subunit of PP2A (52F8) (Cell Signaling, Danvers, MA), Lipin 1, PPAR α , LKB1, Lamin B (Santa Cruz Biotechnologies), PGC-1 α (Chemicon, Billerica, MA) and β -actin (Sigma). Detection was achieved using the EZ-ECL chemiluminescence kit (Amersham). Size of detected proteins was estimated using protein molecular-mass standards (Invitrogen, Barcelona, Spain).

Coimmunoprecipitation studies

Cell nuclear extracts were brought to a final volume of 250 µl with buffer containing 10 mM PBS, 50 mM KCl, 0.05 mM EDTA, 2.5 mM MgCl₂, 8.5% glycerol, 1 mM dithiothreitol, 0.1% Triton X-100, BSA 2% and 1 mg/ml nonfat milk for 18 hours at 4°C and incubated with 4 µg of antibody. Immunocomplex was captured by incubating the samples with 50 µL protein A-agarose suspension for 6 hours at 4°C. Agarose beads were collected by centrifugation and washed. After microcentrifugation, the pellet was resuspended with SDS-PAGE sample buffer and boiled for 5

RESULTATS

min at 100°C. The resulting supernatant was then subjected to electrophoresis on 10% SDS-PAGE and immunoblot analysis.

Determination of ceramide levels

The content of ceramides in liver was determined by the diacylglycerol kinase method as previously described (20).

Analysis of 1-palmitoyl-2-oleyl-phosphatidilcholine (16:0/18:1-PC)

Total lipids of liver homogenates were extracted according to Bligh & Dyer (21), evaporated and redissolved in methanol/water 9:1. Total lipid separation, identification and quantification was carried out by LC/MS using a Hitachi LaChrom Elite L-2130 binary pump and a Hitachi Autosampler L-2200 (Merck) coupled to a Bruker esquire6000 ion-trap mass spectrometer (22,23). The effluent was split, entering 0.2 ml/min to the electrospray interface of the mass spectrometer. The nebulizer was set to 30 psi, the dry gas to 8 l/min and the dry temperature to 350 °C. The column used was a Supelcosil LC-18 of 5 µm particle size, 250 x 2.1 mm (Sigma-Aldrich) protected with a Supelguard LC-18 20 x 2.1 mm guard cartridge column (Sigma-Aldrich). The mobile phase used was a gradient of solvent A (methanol/water/hexane/ammonium hydroxide, 87.5:10.5:1.5:0.5 v/v/v/v), solvent B (methanol/hexane/ammonium hydroxide, 87.5:12:0.5 v/v/v/v) and solvent C (methanol/water, 9:1 v/v). The gradient started at 100%A, decreased linearly to 50% A (50 % B) in 17.5 min, and to 0% A (100% B) in 12.5 min, maintained at 100 % B for 5 min and then changed to 100 % C in 3 min, maintained 9 min and changed to 100 % B in 3 min. The flow rate was 0.5 ml/min and the injection volume was 80 µl. Data acquisition was carried out in full scan and positive mode, detecting PC species as $[M^+H]^+$ ions with the capillary current set at -4000 V. The PC(16:0/18:1) species was characterized by tandem MS in multiple reaction monitoring and negative mode, with a post-column addition of acetic acid for $[M + CH_3CO_2]^-$ adduct formation (100µl/h). 1,2-Dinonadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocoline, $m/z = 818.6$ was used as internal standard and also in a calibration curve for quantitation.

High Performance Liquid Chromatography Measurement of ATP, ADP, and AMP

Adenine nucleotides were separated by high performance liquid chromatography using an X-Bridge column with a 3.5 μm outer diameter (100 x 4.6 cm). Elution was done with 0.1 mM potassium dihydrogen phosphate, pH 6, containing 4 mM tetrabutylammonium hydrogen sulfate and 15% (v/v) methanol. The conditions were as follows: 20 μl sample injection, column at room temperature, flow rate of 0.6 ml min^{-1} and UV monitoring at 260 nm.

Statistical Analyses

Results are expressed as means \pm S.D. of 5 separate experiments. Significant differences were established by one-way ANOVA using the GraphPad InStat programme (GraphPad Software V2.03) (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). When significant variations were found, the Tukey-Kramer multiple comparisons test was applied. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results

Effects of GW501516 treatment on plasma lipid levels, liver triglyceride content and glucose-tolerance test in mice fed the HFD.

Most of the studies performed using PPAR β/δ agonists were based on long-term drug treatment, leading to a significant reduction in weight loss and fat mass (24,25), which affect both lipid metabolism and insulin sensitivity. To prevent the interference of weight loss in the parameters analyzed, mice were treated with the PPAR β/δ agonist for 3 weeks. After this period, mice receiving the HFD or the HFD plus the drug showed no significant differences in body weight compared to control mice (control: 30.4 \pm 2.8 g, HFD: 30.0 \pm 2.5 g, and HFD+GW501516: 31.4 \pm 2.7 g) and the amount of food consumed was similar in all the three groups (data not shown). In addition, mice fed HFD or HFD plus GW501516 showed no significant changes in the levels of plasma total cholesterol, glucose, insulin, adiponectin, leptin or non-esterified fatty acids compared to controls (data not shown). In contrast, mice fed the HFD had enhanced plasma triglyceride levels compared to controls (55 \pm 2.5 vs. 123 \pm 29 mg/dl, 2.2-fold induction, $p < 0.05$), whereas this increase was abolished by GW501516 treatment (69 \pm 16 mg/dl, $p < 0.01$ vs. HFD-fed

RESULTATS

mice) (Figure 1A). The HFD also enhanced the liver triglyceride content (4.5-fold induction, $p < 0.05$) (Figure 1B). However, drug treatment did not affect this parameter, which is in line with a previous study (9). When subjected to a glucose-tolerance test, which evaluates the ability of the body to adjust glucose levels after an acute glucose injection, glucose levels of control mice peaked at 30 min and returned to the basal level (Figure 1C). As expected, mice fed with the HFD were glucose-intolerant, as demonstrated by the significant increase in the area under the curve (AUC). In contrast, mice fed with the HFD and treated with GW501516 showed an improved response to the glucose challenge, and the AUC of their glucose-tolerance test was similar to that of controls.

GW501516 treatment restores PGC-1 α expression and increases nuclear Lipin 1 in liver of mice fed the HFD.

To gain further understanding of the effects of GW501516 on the fate of fatty acids, either incorporated into triglycerides or oxidized, we analysed the levels of Lipin 1, which has been reported to be under the control of AMPK (26). The HFD strongly reduced the hepatic mRNA levels of Lipin 1 compared to mice fed a standard diet and this reduction was prevented in mice treated with the PPAR β/δ activator (Figure 2A). The cytosolic protein levels of Lipin 1 were not significantly affected by the HFD or by the drug treatment (Figure 2B). In contrast, GW501516 increased the protein levels of Lipin 1 in the nucleus (Figure 2C), where it acts as a transcriptional coactivator linked to fatty acid oxidation (16). Likewise, the expression of the transcriptional coactivator PGC-1 α involved in fatty acid oxidation, was markedly reduced by HFD in liver and this reduction was prevented by GW501516 (Figure 2C).

GW501516 treatment increases PPAR α expression and activity and fatty acid oxidation in liver of mice fed the HFD.

Since it has been reported that hepatic Lipin 1 overexpression results in enhanced expression of *Ppar α* gene and its target genes, such as *Cpt1a* and *Mcad* (16), we assessed whether the

increase in nuclear lipin 1 protein levels caused by GW501516 treatment led to these changes. GW501516 increased the mRNA and the nuclear protein levels of PPAR α (Figure 3A and B). In addition, given that it has been demonstrated that lipin 1 activates the transcription of PPAR α in cooperation with PGC-1 α (16), we evaluated the effect of drug treatment on PPAR α DNA-binding activity by performing EMSA. The PPRE probe formed two main complexes (I and II) with hepatic nuclear proteins (Figure 3C). The specificity of these two DNA-binding complexes was assessed in competition experiments by adding an excess of unlabeled PPRE oligonucleotide. PPAR α DNA-binding activity was higher in mice fed HFD plus GW501516 than in control and HFD-fed mice. Addition of antibody against PPAR α supershifted complex II, thereby indicating that this complex contained PPAR α . In contrast, no supershifted was observed with an antibody against PPAR β . In line with the increase in the expression of PPAR α and its DNA-binding activity, GW501516 treatment increased the expression of the PPAR-target genes *Mcad*, *Cte* and *Cpt1a* compared to control and HFD-fed mice (Figure 3D, E and F). Consistent with the increase in the expression of PPAR α -target genes involved in hepatic fatty acid oxidation, levels of plasma β -hydroxybutyrate, a product of ketogenesis used as a marker of hepatic fatty acid oxidation, were significantly elevated in mice receiving the HFD plus GW501516 (Figure 3G). Collectively, these findings indicate that GW501516, similarly to overexpression of *Lipin 1* (16), amplifies the PPAR α -PGC-1 α pathway and thus increases hepatic fatty acid oxidation.

GW501516 treatment increases the levels of the hepatic endogenous PPAR α ligand 16:0/18:1-PC in mice fed the HFD.

The increase in the PPAR α pathway following GW501516 treatment was higher than that expected on the basis of the increase in Lipin 1. This led us to speculate that additional mechanisms might contribute to the effects observed after GW501516 treatment. We focused on the possibility that GW501516 might increase the levels of an endogenous ligand of PPAR α . An endogenous ligand for PPAR α in liver has recently been reported, 16:0/18:1-PC (27). The synthesis of this ligand involves the enzymatic activity of CEPT1, and overexpression of *Cept1* in

RESULTATS

hepatoma cells increases the expression of PPAR α -target genes, such as *Cpt1a* (27). First, we determined whether GW501516 affected the expression of *Cept1*. Both, HFD and HFD plus GW501516 increased *Cept1* expression, but the increase attributable to GW501516 was significantly higher than that caused by HFD alone (Figure 4A). Interestingly, when we analysed the levels of 16:0/18:1-PC, only those mice receiving the GW501516 showed increased levels of this PPAR α endogenous ligand (Figure 4B).

GW501516 treatment increases the mRNA levels of hepatic Vldl receptor in mice fed the HFD.

The increase in hepatic fatty acid oxidation following GW501516 treatment seemed to be inconsistent with the lack of effect of this drug on hepatic triglyceride content. Although, this has been reported to be the result of the increase in glucose flux through the pentose phosphate pathway and enhanced fatty acid synthesis caused by GW501516 (9), we explored additional mechanisms by studying the effects of this drug on the *Vldl receptor*, which may be a novel PPAR β/δ -target gene (28) and its expression may be increased by AMPK (29). This receptor is expressed abundantly in heart, skeletal muscle and adipose tissue but only in trace amounts in the liver (30). In addition, in vitro studies have shown that the VLDL receptor binds and internalises triglyceride-rich lipoproteins, including VLDL, in adipose tissue and skeletal muscle, thus reducing plasma triglyceride levels (31). In line with this, expression of the *Vldl receptor* was high in skeletal muscle (Figure 5A) and absent in liver (Figure 5B) of control mice. Interestingly, GW501516 did not affect *Vldl receptor* expression in skeletal muscle, although it increased it in liver (Figure 5). These findings may contribute to explain both the reduction in plasma triglycerides and the lack of reduction in the content of liver triglycerides after GW501516 treatment as a result of increased liver triglyceride uptake from the plasma.

GW501516 treatment restores phospho-AMPK and increases AMP/ATP ratio in liver of mice fed the HFD.

Given the prominent role of AMPK in liver fatty acid oxidation (13) and the fact that this kinase upregulates the expression of *Lipin 1* (26), the *Vldl receptor* (29) and *Pgc-1 α* (32), we analyzed the hepatic levels of total and phosphorylated AMPK. In agreement with previous studies (33), HFD reduced phospho-AMPK α levels in liver (Figure 6A). Interestingly, GW501516 treatment blunted this reduction. Since inhibitory crosstalk between AMPK and ERK1/2 has been reported (34), and since AMPK inhibition increases ERK1/2 phosphorylation in liver (35) we examined the phosphorylation status of this kinase. The reduction in phospho-AMPK α observed in mice fed the HFD was accompanied by an increase in phospho-ERK1/2 levels, whereas this increase was attenuated by GW501516 treatment (Figure 6B). Since the prevention of the reduction in phospho-AMPK levels following GW501516 treatment may be responsible for the increase in the Lipin 1/PPAR α -PGC-1 α signaling system we explored the potential mechanisms involved. The control of AMPK is complex and its phosphorylation status is regulated by both phosphatases and kinases (13). First, we evaluated whether the reduction in phospho-AMPK caused by the HFD was dependent on activation of protein phosphatase 2A (PP2A) activation via ceramide accumulation, as previously reported (36). When we analysed the content of ceramide and the abundance of the PP2A catalytic subunit we did not detect significant changes in the different groups of study, suggesting that this pathway was not involved in the changes observed (Figure 7A and B). AMPK is activated by upstream kinases: a Ca²⁺-dependent pathway mediated by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase (CaMKK β), the pathway mediated by TAK1 (transforming growth factor- β -activated kinase-1) and especially by the AMP-dependent pathway mediated by LKB1 (the tumor suppressor kinase) (13). Interestingly, LKB1 deacetylation is regulated by SIRT1 (silent information regulator T1) (37), influencing its ability to activate AMPK, and it has been recently reported that PPAR β/δ increases SIRT1 expression (38). Thus, we explored whether SIRT1 was involved in the changes observed after GW501516 treatment. The protein levels of SIRT1 were higher in the liver of both mice fed with HFD and mice fed with HFD plus GW501516 compared to control mice (Figure 7C). However, when we examined the acetylation status of LKB1 we did not observe changes (Figure 7D), suggesting that SIRT1 was

RESULTATS

not involved in AMPK regulation by GW501516. Finally, since AMPK is activated by an increase in the AMP/ATP ratio we measured adenine nucleotide concentrations by high performance liquid chromatography in liver to determine the hepatic ATP/ADP and AMP/ATP ratios to further investigate the underlying mechanism of GW501516 on AMPK activation. GW501516 significantly increased the AMP/ATP ratio (Figure 7E) and decreased the ATP/ADP ratio (Figure 7F) compared to control and HFD-diet fed mice. Overall, these findings indicate that the increase in AMPK phosphorylation following GW501516 treatment was caused by a reduction in hepatocyte energy status.

Discussion

Excessive caloric intake can convert fatty acids into signaling molecules that, in liver, accelerate the production of glucose and lipoproteins, which contribute to the development of human diseases, such as obesity, insulin resistance and metabolic syndrome. PPAR β/δ agonists are promising drugs for the treatment of these diseases. We followed a pharmacological approach to examine the role of PPAR β/δ in regulating fatty acid oxidation in liver of mice fed an HFD. Our findings demonstrate that treatment with the PPAR β/δ agonist GW501516 prevents the development of hypertriglyceridemia caused by the HFD. They also show that drug treatment prevents the reduction in hepatic phospho-AMPK levels induced by HFD and increases hepatic fatty acid oxidation by amplifying the activity of the Lipin 1-PPAR α -PGC-1 α pathway.

Hepatocytes are exposed to dietary signals (from portal blood flow) and systemic signals (from the arterial blood supply). In contrast to other studies using long term exposures to the HFD, mice were challenged with HFD for a short period of three weeks to examine the seminal changes involved in the development of metabolic dysregulation caused by this diet. Mice exposed to HFD developed hypertriglyceridemia and glucose intolerance, but they did not show significant differences in plasma non-esterified fatty acids, leptin or adiponectin, thus avoiding the interfering effects of these systemic adipocyte-derived signals on liver metabolism. Exposure to HFD also

led to a reduction in hepatic phospho-AMPK levels that was prevented by GW501516. The maintenance of AMPK phosphorylation was accompanied by the recovery in the expression levels of *Lipin 1* and *Pgc-1 α* and the increase in the mRNA levels of the *Vldl receptor* (Figure 8). Although we cannot rule out direct transcriptional activation of these gene by PPAR β/δ since it has been suggested that *Lipin 1*, the *Vldl receptor* (28) and *Pgc-1 α* (39) might be PPAR β/δ -target genes, most effects of GW501516 may be the result of the increase in AMPK phosphorylation (14). In fact, it has been reported that this kinase upregulates the expression of *Lipin 1* (26), the *Vldl receptor* (29) and *Pgc-1 α* (32). The increase in AMPK phosphorylation following GW501516 treatment might involve several mechanisms. Since inhibitory crosstalk between ERK1/2 and AMPK has been reported (34), the increase in phospho-AMPK levels could be the result of the inhibition by GW501516 of the phosphorylation of ERK1/2 induced by the HFD, which is in agreement with our previous study reporting that GW501516 prevents LPS-induced ERK1/2 phosphorylation in adipocytes (40). It is important to note that a previous study found that obesity leads to increased hepatic ERK1/2 activity and that caloric restriction blunts this increase and improves insulin sensitivity (41). In the present study, the improvement in glucose tolerance caused by GW501516 was also accompanied by the reduction in phospho-ERK1/2 levels. An additional mechanism could involve SIRT1, since it has recently been reported that pharmacological PPAR β/δ activation increases the expression of SIRT1 (38), a deacetylase which regulates AMPK activity (42) through LKB1 acetylation (37) and might be essential to the regulatory loop involving PPAR α , PGC-1 α and Lipin 1 (43). However, our findings make this possibility unlikely given that the increase in SIRT1 levels induced by GW501516 did not modify the acetylation status of LKB1. Interestingly, here we show that GW501516 increases the AMP/ATP ratio in liver, indicating that, in line with a previous study in skeletal muscle cells (14), the underlying mechanism responsible for the increase in AMPK phosphorylation induced by this drug could be a modification of cellular energy status. Previous studies have suggested that the reduction in ATP levels caused by GW501516 can be the result of a specific inhibition of one or more complexes of the respiratory chain, an effect on the ATP synthase system, or to

RESULTATS

mitochondrial uncoupling (14). These potential changes would reduce the yield of ATP synthesis by the mitochondria, leading to AMPK activation.

In agreement with the reported regulation of PGC-1 α (32,44,45) and Lipin 1 (26) by AMPK, exposure to the HFD reduced both *Pgc-1 α* and *Lipin 1* expression. The reduction in Lipin 1 is likely to be the result of the decrease of PGC-1 α , since it has been reported that genetic reduction of hepatic PGC-1 α decreases the expression of *Lipin 1* (46). In addition, it has been shown that physiological stimuli that increase mitochondrial fatty acid oxidation induce PGC-1 α gene expression, which in turn activates the expression of *Lipin 1* (16). Interestingly, it has been reported that upregulation of Lipin 1 in liver increases PPAR α activity by two mechanisms: transcriptional activation of the *Ppar α* gene and direct coactivation of PPAR α in cooperation with PGC-1 α (16). Thus, Lipin 1 is considered to be an inducible “booster” that amplifies pathways downstream PGC-1 α -PPAR α , mainly mitochondrial fatty acid oxidation (16). In agreement with this, GW501516 treatment prevented the reduction in PGC-1 α increased the nuclear protein levels of Lipin 1 and amplified the PGC-1 α -PPAR α pathway, as demonstrated by the increase in the transcriptional activation of *Ppar α* and the increase in PPAR α transcriptional activity (shown by the EMSA and enhanced PPAR α -target gene expression). These effects subsequently enhanced hepatic fatty acid oxidation, as shown by the increase in β -hydroxybutyrate levels. The reduction in PGC-1 α and Lipin 1 levels caused by the HFD and their restoration after GW501516 treatment observed in this study may also contribute to the changes of plasma triglyceride levels, since both proteins are involved in the control of hepatic triglyceride secretion and fatty acid oxidation. Thus, activation of PGC-1 α in liver reduces triglyceride production and secretion (47), whereas hepatic reduction of mRNA and protein levels of PGC-1 α impairs fatty acid oxidation and leads to hypertriglyceridemia (46). Likewise, *Lipin 1* overexpression suppresses triglyceride secretion by the liver (48). In addition, the hepatic expression of *Lipin 1* is reduced in obese insulin-resistant mice, whereas overexpression of *Lipin 1* in liver of these mice inhibits triglyceride secretion and improves hepatic insulin signaling (48). Overall, the prevention of the reduction in

PGC-1 α and Lipin 1, the amplification of the PPAR α pathway and the increase in fatty acid oxidation caused by GW501516 may be responsible for the reduction in triglyceride levels and the improvement in glucose tolerance. These data implicate PGC-1 α and Lipin 1 in the hypotriglyceridemic effect of PPAR β/δ and complement the findings of a previous study reporting that elevated plasma triglyceride levels in PPAR β/δ -null mouse were related to a combination of increased VLDL production and decreased plasma triglyceride clearance (11).

The data reported here also demonstrate that PPAR β/δ activation by GW501516 can amplify the PPAR α pathway by an additional mechanism. Previous studies had demonstrated that hepatic fatty acid synthase (FAS) was necessary for the normal activation of PPAR α target genes but did not identify the ligand involved in this process (49). Recently, this endogenous PPAR α ligand was identified as 16:0/18:1-PC (27). The synthesis of this ligand requires FAS activity, which yields palmitate (16:0), whereas 16:0/18:1-PC is generated through the enzymatic activity of CEPT1 (27). Subsequent binding of 16:0/18:1-PC to PPAR α in the nucleus turns on PPAR α -dependent genes and affects hepatic lipid metabolism. Interestingly, activation of PPAR β/δ by GW501516 induces FAS expression in liver as a result of increased glycolysis and the pentose phosphate shunt (9). Our findings confirm that GW501516 also increases *Cept1* expression and the levels of 16:0/18:1-PC, contributing to further amplification of the PPAR α pathway.

The increase in fatty acid oxidation caused by GW501516 is apparently inconsistent with its lack of effects on hepatic triglyceride levels. Several reasons may account for this. First, similar to the effects of GW501516, which restores Lipin 1 levels, hepatic *Lipin 1* overexpression leads to increased liver triglyceride content (16). This apparently conflicts with the effects of Lipin 1 on fatty acid oxidation, but it has been explained by hepatic triglyceride sequestration secondary to diminished triglyceride secretion, increased fatty acid uptake, or the PAP activity of Lipin 1 (16). Second, in this study we report an additional possibility, the increase caused by GW501516 in the expression of the *Vldl receptor* in liver. The huge increase of this receptor observed in liver after

RESULTATS

GW501516 treatment might also reduce plasma triglyceride levels by increasing VLDL uptake by the liver. However, this can also lead to an increase in hepatic triglyceride content. Third, it has been reported that GW501516 improves hyperglycemia by increasing glucose flux through the pentose phosphate pathway and enhancing fatty acid synthesis in liver (9). In that study, GW501516 increased liver triglyceride content but the authors reported that although this might raise concerns that long-term drug treatment might cause hepatic steatosis, they did not observe signs of fatty liver with treatment up to 6 months. In addition, long-term GW501516 treatment has been shown to reduce body weight and levels of circulating and liver triglycerides (24,50).

In summary, our findings indicate that PPAR β/δ activation by GW501516 amplify the PPAR α -PGC1- α pathway through the restoration of AMPK activity, contributing to the hypotriglyceridemic effect of this drug.

Acknowledgments

This study was partly supported by funds from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2009- 06939 and BFU2010-18826) and the European Union ERDF funds. R. R.-C. was supported by a grant from the Fundación Ramón Areces. L. S.-M. was supported by a FPI grant from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación. A.M.A. was supported by a predoctoral fellowship from the Regional Government of Castile and León.

We would like to thank the University of Barcelona's Language Advisory Service for its help. CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM) is an initiative of ISCIII (Ministerio de Ciencia e Innovación). We thank Ester Miralles for technical assistance with HPLC.

References

1. Bertoni, A. G., Wong, N. D., Shea, S., Ma, S., Liu, K., Preethi, S., Jacobs, D. R., Jr., Wu, C., Saad, M. F. et al. 2007. Insulin resistance, metabolic syndrome, and subclinical atherosclerosis: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Diabetes Care*.**30**:2951-2956.
2. Grundy, S. M. 1998. Hypertriglyceridemia, atherogenic dyslipidemia, and the metabolic syndrome. *Am. J. Cardiol*.**81**:18B-25B.
3. Adiels, M., Olofsson, S. O., Taskinen, M. R. and Boren, J. 2008. Overproduction of very low-density lipoproteins is the hallmark of the dyslipidemia in the metabolic syndrome. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*.**28**:1225-1236.
4. Kersten, S., Desvergne, B. and Wahli, W. 2000. Roles of PPARs in health and disease. *Nature*.**405**:421-424.
5. Michalik, L., Auwerx, J., Berger, J. P., Chatterjee, V. K., Glass, C. K., Gonzalez, F. J., Grimaldi, P. A., Kadowaki, T., Lazar, M. A. et al. 2006. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol. Rev*.**58**:726-741.
6. Braissant, O., Fougère, F., Scotto, C., Dauca, M. and Wahli, W. 1996. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR- α , - β , and - γ in the adult rat. *Endocrinology*.**137**:354-366.
7. Barak, Y., Liao, D., He, W., Ong, E. S., Nelson, M. C., Olefsky, J. M., Boland, R. and Evans, R. M. 2002. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor delta on placentation, adiposity, and colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*.**99**:303-308.
8. Peters, J. M., Lee, S. S., Li, W., Ward, J. M., Gavrilova, O., Everett, C., Reitman, M. L., Hudson, L. D. and Gonzalez, F. J. 2000. Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor beta(delta). *Mol. Cell Biol*.**20**:5119-5128.
9. Lee, C. H., Olson, P., Hevener, A., Mehl, I., Chong, L. W., Olefsky, J. M., Gonzalez, F. J., Ham, J., Kang, H. et al. 2006. PPARdelta regulates glucose metabolism and insulin sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*.**103**:3444-3449.
10. Oliver, W. R., Jr., Shenk, J. L., Snaith, M. R., Russell, C. S., Plunket, K. D., Bodkin, N. L., Lewis, M. C., Winegar, D. A., Sznaidman, M. L. et al. 2001. A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*.**98**:5306-5311.
11. Akiyama, T. E., Lambert, G., Nicol, C. J., Matsusue, K., Peters, J. M., Brewer, H. B., Jr. and Gonzalez, F. J. 2004. Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta regulates very low density lipoprotein production and catabolism in mice on a Western diet. *J. Biol. Chem*.**279**:20874-20881.

12. Lewis, G. F.1997. Fatty acid regulation of very low density lipoprotein production. *Curr. Opin. Lipidol.***8**:146-153.
13. Zhang, B. B., Zhou, G. and Li, C.2009. AMPK: an emerging drug target for diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metab.***9**:407-416.
14. Kramer, D. K., Al-Khalili, L., Guigas, B., Leng, Y., Garcia-Roves, P. M. and Krook, A.2007. Role of AMP kinase and PPARdelta in the regulation of lipid and glucose metabolism in human skeletal muscle. *J. Biol. Chem.***282**:19313-19320.
15. Bou, K. M., Sundaram, M., Zhang, H. Y., Links, P. H., Raven, J. F., Manmontri, B., Sariahmetoglu, M., Tran, K., Reue, K. et al.2009. The level and compartmentalization of phosphatidate phosphatase-1 (lipin-1) control the assembly and secretion of hepatic VLDL. *J. Lipid Res.***50**:47-58.
16. Finck, B. N., Gropler, M. C., Chen, Z., Leone, T. C., Croce, M. A., Harris, T. E., Lawrence, J. C., Jr. and Kelly, D. P.2006. Lipin 1 is an inducible amplifier of the hepatic PGC-1alpha/PPARalpha regulatory pathway. *Cell Metab.***4**:199-210.
17. Rodriguez-Calvo, R., Barroso, E., Serrano, L., Coll, T., Sanchez, R. M., Merlos, M., Palomer, X., Laguna, J. C. and Vazquez-Carrera, M.2009. Atorvastatin prevents carbohydrate response element binding protein activation in the fructose-fed rat by activating protein kinase A. *Hepatology.***49**:106-115.
18. Freeman, W. M., Walker, S. J. and Vrana, K. E.1999. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques.***26**:112-115.
19. Coll, T., varez-Guardia, D., Barroso, E., Gomez-Foix, A. M., Palomer, X., Laguna, J. C. and Vazquez-Carrera, M.2010. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- δ by GW501516 prevents fatty acid-induced nuclear factor- κ B activation and insulin resistance in skeletal muscle cells. *Endocrinology.***151**:1560-1569.
20. Planavila, A., Alegret, M., Sanchez, R. M., Rodriguez-Calvo, R., Laguna, J. C. and Vazquez-Carrera, M.2005. Increased Akt protein expression is associated with decreased ceramide content in skeletal muscle of troglitazone-treated mice. *Biochem. Pharmacol.***69**:1195-1204.
21. BLIGH, E. G. and DYER, W. J.1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.***37**:911-917.
22. Balgoma, D., Montero, O., Balboa, M. A. and Balsinde, J.2008. Calcium-independent phospholipase A2-mediated formation of 1,2-diarachidonoyl-glycerophosphoinositol in monocytes. *FEBS J.***275**:6180-6191.
23. Balgoma, D., Astudillo, A. M., Perez-Chacon, G., Montero, O., Balboa, M. A. and Balsinde, J.2010. Markers of monocyte activation revealed by lipidomic profiling of arachidonic acid-containing phospholipids. *J Immunol.***184**:3857-3865.
24. Wang, Y. X., Zhang, C. L., Yu, R. T., Cho, H. K., Nelson, M. C., Bayuga-Ocampo, C. R., Ham, J., Kang, H. and Evans, R. M.2004. Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARdelta. *PLoS. Biol.***2**:e294.

RESULTATS

25. Wang, Y. X., Lee, C. H., Tiep, S., Yu, R. T., Ham, J., Kang, H. and Evans, R. M.2003. Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell*.**113**:159-170.
26. Higashida, K., Higuchi, M. and Terada, S.2008. Potential role of lipin-1 in exercise-induced mitochondrial biogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.***374**:587-591.
27. Chakravarthy, M. V., Lodhi, I. J., Yin, L., Malapaka, R. R., Xu, H. E., Turk, J. and Semenkovich, C. F.2009. Identification of a physiologically relevant endogenous ligand for PPARalpha in liver. *Cell*.**138**:476-488.
28. Sanderson, L. M., Boekschoten, M. V., Desvergne, B., Muller, M. and Kersten, S.2010. Transcriptional profiling reveals divergent roles of PPARalpha and PPARbeta/delta in regulation of gene expression in mouse liver. *Physiol Genomics*.**41**:42-52.
29. Zenimaru, Y., Takahashi, S., Takahashi, M., Yamada, K., Iwasaki, T., Hattori, H., Imagawa, M., Ueno, M., Suzuki, J. et al.2008. Glucose deprivation accelerates VLDL receptor-mediated TG-rich lipoprotein uptake by AMPK activation in skeletal muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.***368**:716-722.
30. Gafvels, M. E., Paavola, L. G., Boyd, C. O., Nolan, P. M., Wittmaack, F., Chawla, A., Lazar, M. A., Bucan, M., Angelin, B. O. et al.1994. Cloning of a complementary deoxyribonucleic acid encoding the murine homolog of the very low density lipoprotein/apolipoprotein-E receptor: expression pattern and assignment of the gene to mouse chromosome 19. *Endocrinology*.**135**:387-394.
31. Takahashi, S., Kawarabayasi, Y., Nakai, T., Sakai, J. and Yamamoto, T.1992. Rabbit very low density lipoprotein receptor: a low density lipoprotein receptor-like protein with distinct ligand specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.***89**:9252-9256.
32. Lee, W. J., Kim, M., Park, H. S., Kim, H. S., Jeon, M. J., Oh, K. S., Koh, E. H., Won, J. C., Kim, M. S. et al.2006. AMPK activation increases fatty acid oxidation in skeletal muscle by activating PPARalpha and PGC-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.***340**:291-295.
33. Muse, E. D., Obici, S., Bhanot, S., Monia, B. P., McKay, R. A., Rajala, M. W., Scherer, P. E. and Rossetti, L.2004. Role of resistin in diet-induced hepatic insulin resistance. *J. Clin. Invest.***114**:232-239.
34. Du, J., Guan, T., Zhang, H., Xia, Y., Liu, F. and Zhang, Y.2008. Inhibitory crosstalk between ERK and AMPK in the growth and proliferation of cardiac fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.***368**:402-407.
35. Lu, D. Y., Tang, C. H., Chen, Y. H. and Wei, I. H.2010. Berberine suppresses neuroinflammatory responses through AMP-activated protein kinase activation in BV-2 microglia. *J. Cell Biochem.***110**:697-705.
36. Wu, Y., Song, P., Xu, J., Zhang, M. and Zou, M. H.2007. Activation of protein phosphatase 2A by palmitate inhibits AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.***282**:9777-9788.

37. Lan, F., Cacicedo, J. M., Ruderman, N. and Ido, Y.2008. SIRT1 modulation of the acetylation status, cytosolic localization, and activity of LKB1. Possible role in AMP-activated protein kinase activation. *J. Biol. Chem.***283**:27628-27635.
38. Okazaki, M., Iwasaki, Y., Nishiyama, M., Taguchi, T., Tsugita, M., Nakayama, S., Kambayashi, M., Hashimoto, K. and Terada, Y.2010. PPARbeta/delta regulates the human SIRT1 gene transcription via Sp1. *Endocr. J.***57**:403-413.
39. Hondares, E., Pineda-Torra, I., Iglesias, R., Staels, B., Villarroya, F. and Giralt, M.2007. PPARdelta, but not PPARalpha, activates PGC-1alpha gene transcription in muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.***354**:1021-1027.
40. Rodriguez-Calvo, R., Serrano, L., Coll, T., Moullan, N., Sanchez, R. M., Merlos, M., Palomer, X., Laguna, J. C., Michalik, L. et al.2008. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta inhibits lipopolysaccharide-induced cytokine production in adipocytes by lowering nuclear factor-kappaB activity via extracellular signal-related kinase 1/2. *Diabetes.***57**:2149-2157.
41. Zheng, Y., Zhang, W., Pendleton, E., Leng, S., Wu, J., Chen, R. and Sun, X. J.2009. Improved insulin sensitivity by calorie restriction is associated with reduction of ERK and p70S6K activities in the liver of obese Zucker rats. *J. Endocrinol.***203**:337-347.
42. Ruderman, N. B., Xu, X. J., Nelson, L., Cacicedo, J. M., Saha, A. K., Lan, F. and Ido, Y.2010. AMPK and SIRT1: a long-standing partnership? *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab.***298**:E751-E760.
43. Sugden, M. C., Caton, P. W. and Holness, M. J.2010. PPAR control: it's SIRTainly as easy as PGC. *J. Endocrinol.***204**:93-104.
44. Canto, C., Gerhart-Hines, Z., Feige, J. N., Lagouge, M., Noriega, L., Milne, J. C., Elliott, P. J., Puigserver, P. and Auwerx, J.2009. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature.***458**:1056-1060.
45. Jenning, E. H., Schoonjans, K. and Auwerx, J.2010. Reversible acetylation of PGC-1: connecting energy sensors and effectors to guarantee metabolic flexibility. *Oncogene.***29**:4617-4624.
46. Estall, J. L., Kahn, M., Cooper, M. P., Fisher, F. M., Wu, M. K., Laznik, D., Qu, L., Cohen, D. E., Shulman, G. I. et al.2009. Sensitivity of lipid metabolism and insulin signaling to genetic alterations in hepatic peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha expression. *Diabetes.***58**:1499-1508.
47. Zhang, Y., Castellani, L. W., Sinal, C. J., Gonzalez, F. J. and Edwards, P. A.2004. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha) regulates triglyceride metabolism by activation of the nuclear receptor FXR. *Genes Dev.***18**:157-169.
48. Chen, Z., Gropler, M. C., Norris, J., Lawrence, J. C., Jr., Harris, T. E. and Finck, B. N.2008. Alterations in hepatic metabolism in fld mice reveal a role for lipin 1 in regulating VLDL-triacylglyceride secretion. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.***28**:1738-1744.

RESULTATS

49. Chakravarthy, M. V., Pan, Z., Zhu, Y., Tordjman, K., Schneider, J. G., Coleman, T., Turk, J. and Semenkovich, C. F.2005. "New" hepatic fat activates PPARalpha to maintain glucose, lipid, and cholesterol homeostasis. *Cell Metab.***1**:309-322.
50. Tanaka, T., Yamamoto, J., Iwasaki, S., Asaba, H., Hamura, H., Ikeda, Y., Watanabe, M., Magoori, K., Ioka, R. X. et al.2003. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.***100**:15924-15929.

FIGURE LEGENDS

Figure. 1. GW501516 treatment prevents hypertriglyceridemia and glucose intolerance in mice fed HFD. Mice were fed a standard chow or HFD with or without GW501516 (3 mg/kg/day). After three weeks of treatment, blood samples and livers were obtained. A, plasma triglyceride levels. B, hepatic triglyceride content. C, glucose tolerance test and area under the curve (AUC) (right). Data are expressed as means \pm S.D. (6 mice per group). * $p < 0.05$ vs. control mice. # $p < 0.05$ vs. HFD-fed mice.

Figure. 2. GW501516 treatment increases nuclear LIPIN 1 in liver of mice fed HFD. A, Effects of GW501516 on the mRNA levels of *Lipin 1*. Total RNA was isolated and analyzed by RT-PCR. A representative autoradiogram and the quantification normalized to the *Aprt* mRNA levels are shown. Data are expressed as means \pm S.D. (5 mice per group). Analysis of LIPIN 1 protein levels by immunoblotting of (B) cytosolic (C.E.) and (C) nuclear (N.E.) protein extracts from livers. To show equal loading of protein, the β -actin (total protein) or lamin B (nuclear protein) signal from the same blot is included. Da, Effects of GW501516 on the mRNA levels of *Pgc-1 α* . Autoradiograph data are representative of three separate experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs. control mice. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. HFD-fed mice.

Figure. 3. GW501516 treatment increases PPAR α expression and its DNA-binding activity and fatty acid oxidation in liver of mice fed HFD. A, mRNA levels of *Ppar α* in the livers of mice fed a standard chow or HFD with or without GW501516. Total RNA was isolated and analyzed by RT-PCR. A representative autoradiogram and the quantification normalized to the *Aprt* mRNA levels are shown. B, Analysis of PPAR α protein levels by immunoblotting of nuclear protein extracts

RESULTATS

from livers. To show equal loading of protein, the lamin B signal is included from the same blot. C, Autoradiograph of EMSA performed with a ^{32}P -labeled PPRE nucleotide and nuclear protein extract (NE). Two specific complexes (I and II), based on competition with a molar excess of unlabeled probe are shown. A supershift analysis was performed by incubating NE with an antibody directed against PPAR α , PPAR β and Oct-1. IC: Immunocomplex. Effects of GW501516 on the mRNA levels of *Mcad* (D), *Cte* (E) and *Cpt-1a* (F). G, plasma β -hydroxybutyrate levels in mice fed a standard chow or HFD with or without GW501516. Data are expressed as means \pm S.D. (5 mice per group). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs. control mice. # $p < 0.05$ vs. HFD-fed mice.

Figure. 4. GW501516 treatment increases the levels of the hepatic endogenous PPAR α ligand 16:0/18:1-PC in mice fed HFD. A, mRNA levels of *Cept-1* in the livers of mice fed a standard chow or HFD with or without GW501516. Total RNA was isolated and analyzed by RT-PCR. A representative autoradiogram and the quantification normalized to the *Aprt* mRNA levels are shown. B, Quantification of 16:0/18:1-PC in nuclear extracts from livers of mice fed a standard chow or HFD with or without GW501516. Data are expressed as means \pm S.D. (5 mice per group). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. control mice. # $p < 0.05$ vs. HFD-fed mice.

Figure. 5. GW501516 treatment increases the mRNA levels of hepatic VLDL receptor in mice fed HFD. *Vldl receptor* mRNA levels in skeletal muscle (A) and liver (B) of mice fed a standard chow or HFD with or without GW501516. Total RNA was isolated and analyzed by RT-PCR. A representative autoradiogram and the quantification normalized to the *Aprt* mRNA levels are shown. Data are expressed as means \pm S.D. (5 mice per group).

Figure. 6. GW501516 treatment prevents the reduction in phospho-AMPK and PGC-1 α in liver of mice fed HFD. Analysis of protein levels of phospho-AMPK (A) and phospho-ERK1/2 (B) in the livers of mice fed a standard chow or HFD with or without GW501516. Autoradiograph data are

representative of three separate experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs. control mice. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. HFD-fed mice.

Figure. 7. GW501516 increases the AMP/ATP ratio in liver of mice treated with GW501516. A, Measurement of ceramide levels in the livers of mice fed a standard chow or HFD with or without GW501516. Lipid extracts from livers were prepared and assayed for ceramides as detailed in experimental procedures. Phosphorimage of phosphorylated ceramides, separated by thin layer chromatography, is shown. Analysis of PP2AC (total protein) (B) and SIRT1 (nuclear extracts) (C) by immunoblotting. The blot data are representative of four separate experiments. D, Acetylated levels of LKB1. Immunoprecipitation was performed with an antibody to LKB1 and immunoblotted with an acetyl-lysine antibody. The blot data are representative of four separate experiments. AMP/ATP (E) and ATP/ADP (F) ratio in the livers of mice fed a standard chow or HFD with or without GW501516. Results are means \pm S.D. for data from six livers. *** $p < 0.001$ vs. control mice. ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs. HFD-fed mice.

Figure. 8. A schematic of the potential effects of GW501516 (dashed lines) on liver metabolism is shown. Drug treatment with the PPAR β/δ agonist GW501516 prevents the reduction in phospho-AMPK levels and the subsequent increase in phospho-ERK1/2 levels caused by the HFD. In addition, GW501516 prevents the reduction in PGC-1 α and increases Lipin 1 protein levels in the nucleus leading to amplification of the PPAR α -PGC-1 α pathway, which subsequently induces hepatic fatty acid oxidation. This pathway is additionally increased by GW501516 through the enhanced synthesis of the hepatic PPAR α endogenous ligand 16:0/18:1-PC. As a result of the increase in this pathway the availability of fatty acids to be secreted as triglycerides might be compromised. The increase in the hepatic levels of the VLDL receptor can also contribute to reduce plasma triglyceride levels.

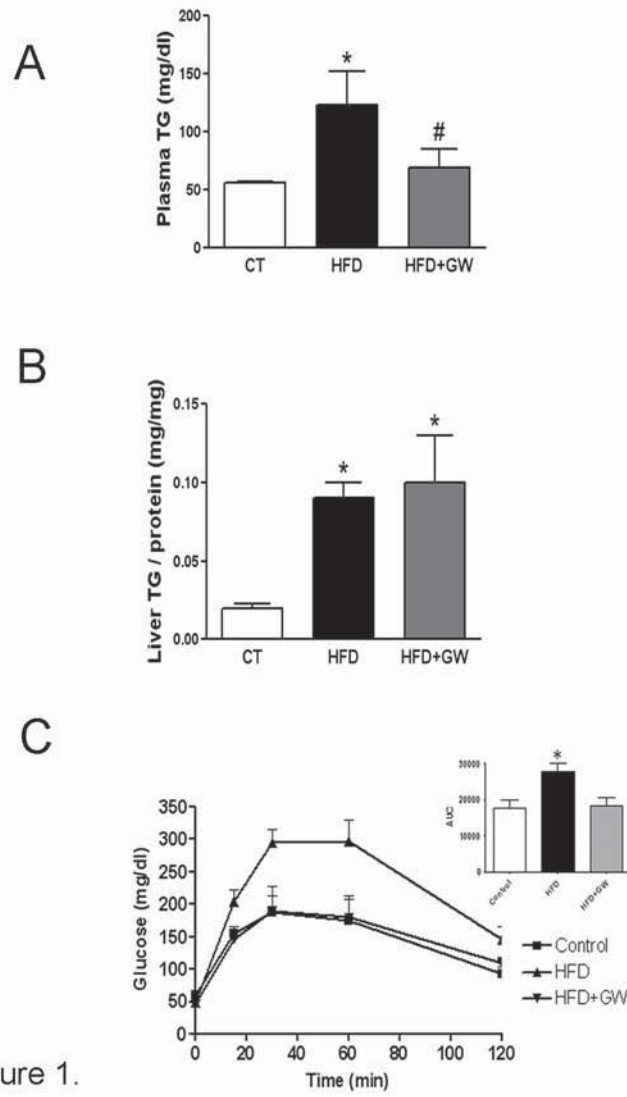


Figure 1.

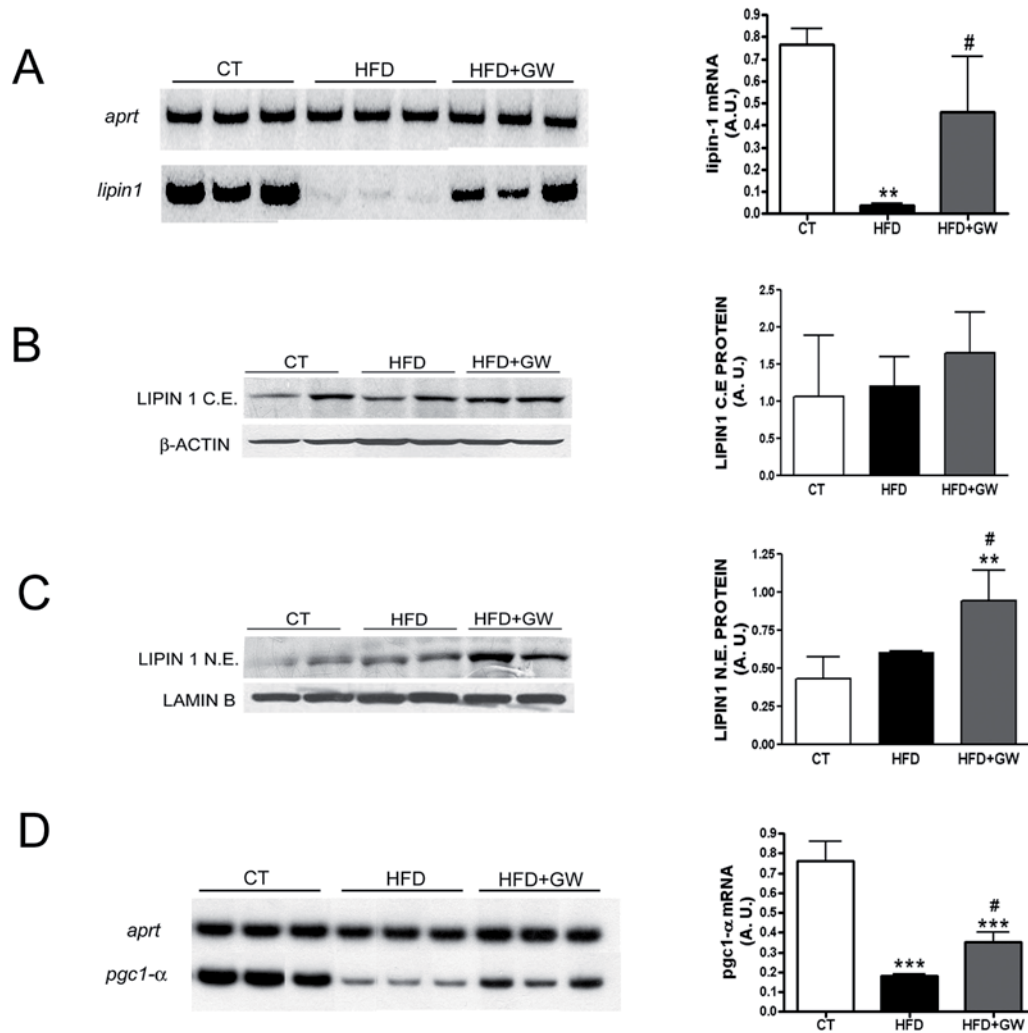


Figure 2.

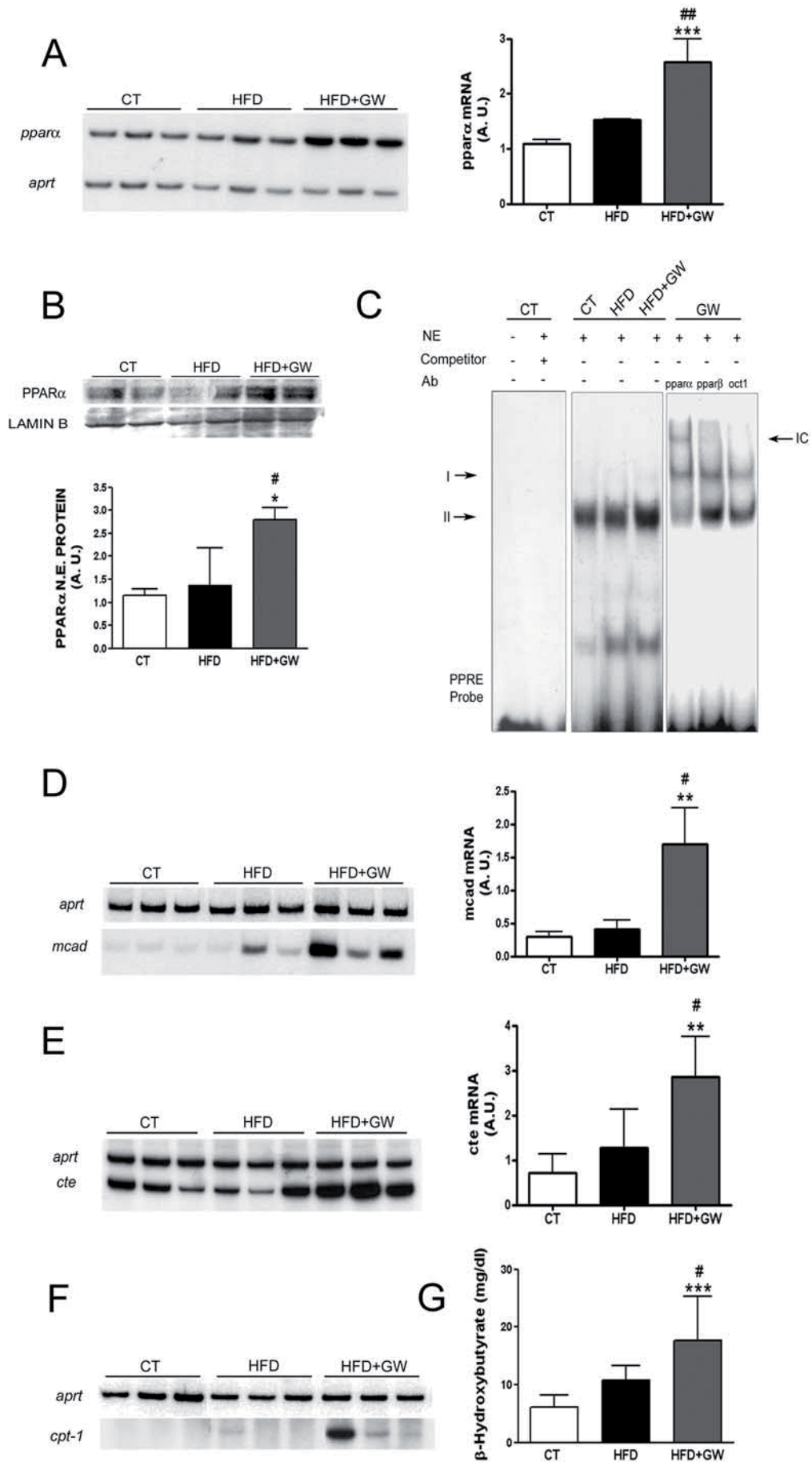


Figure 3.

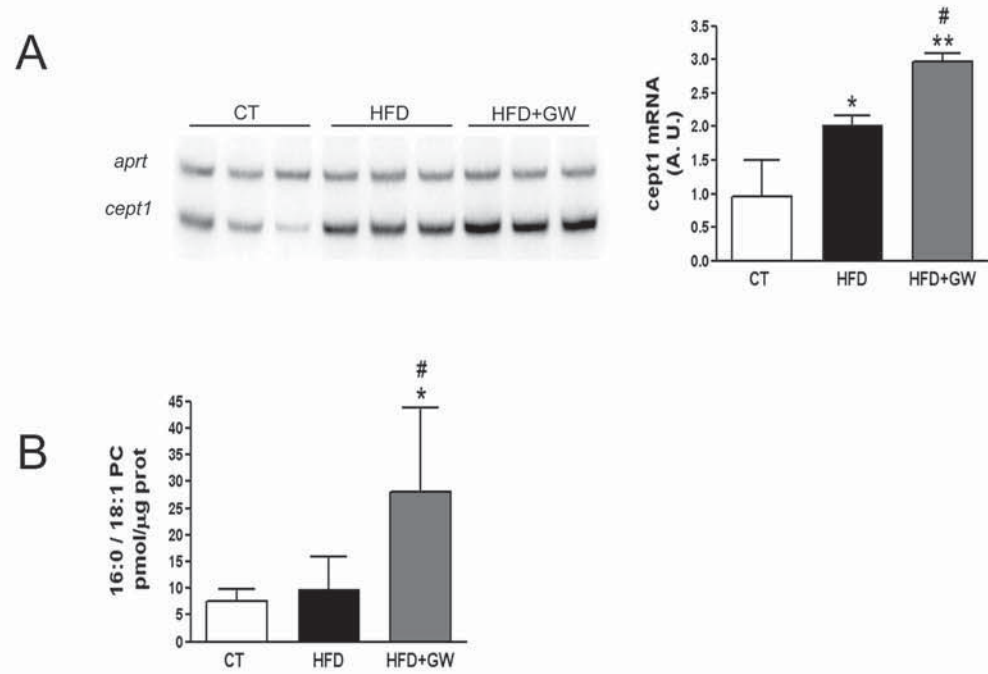
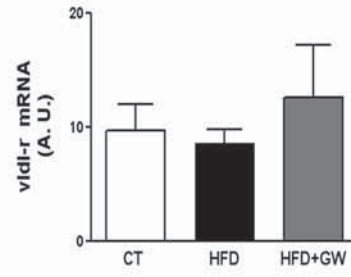
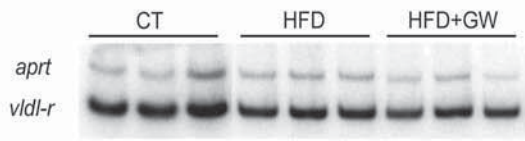


Figure 4.

A



B

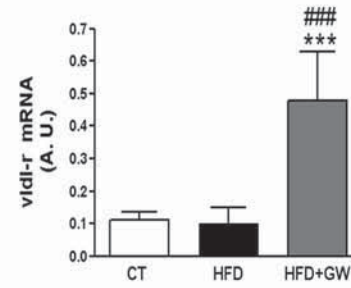
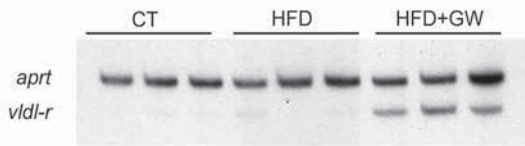


Figure 5.

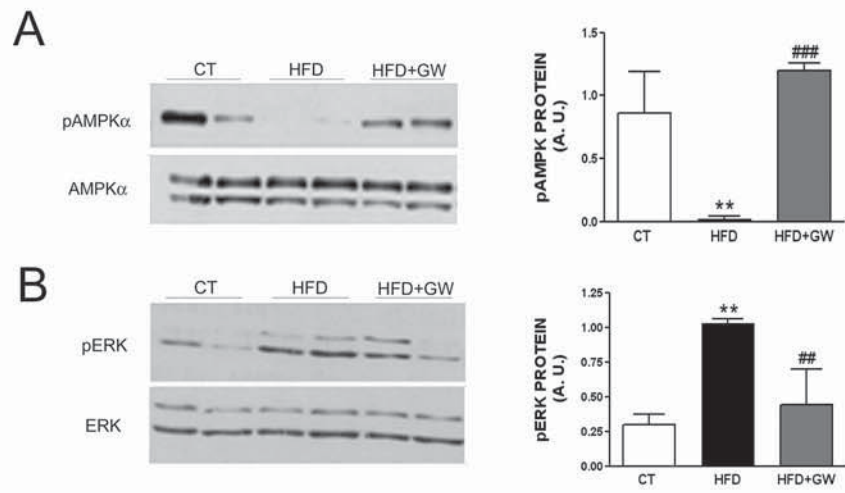


Figure 6.

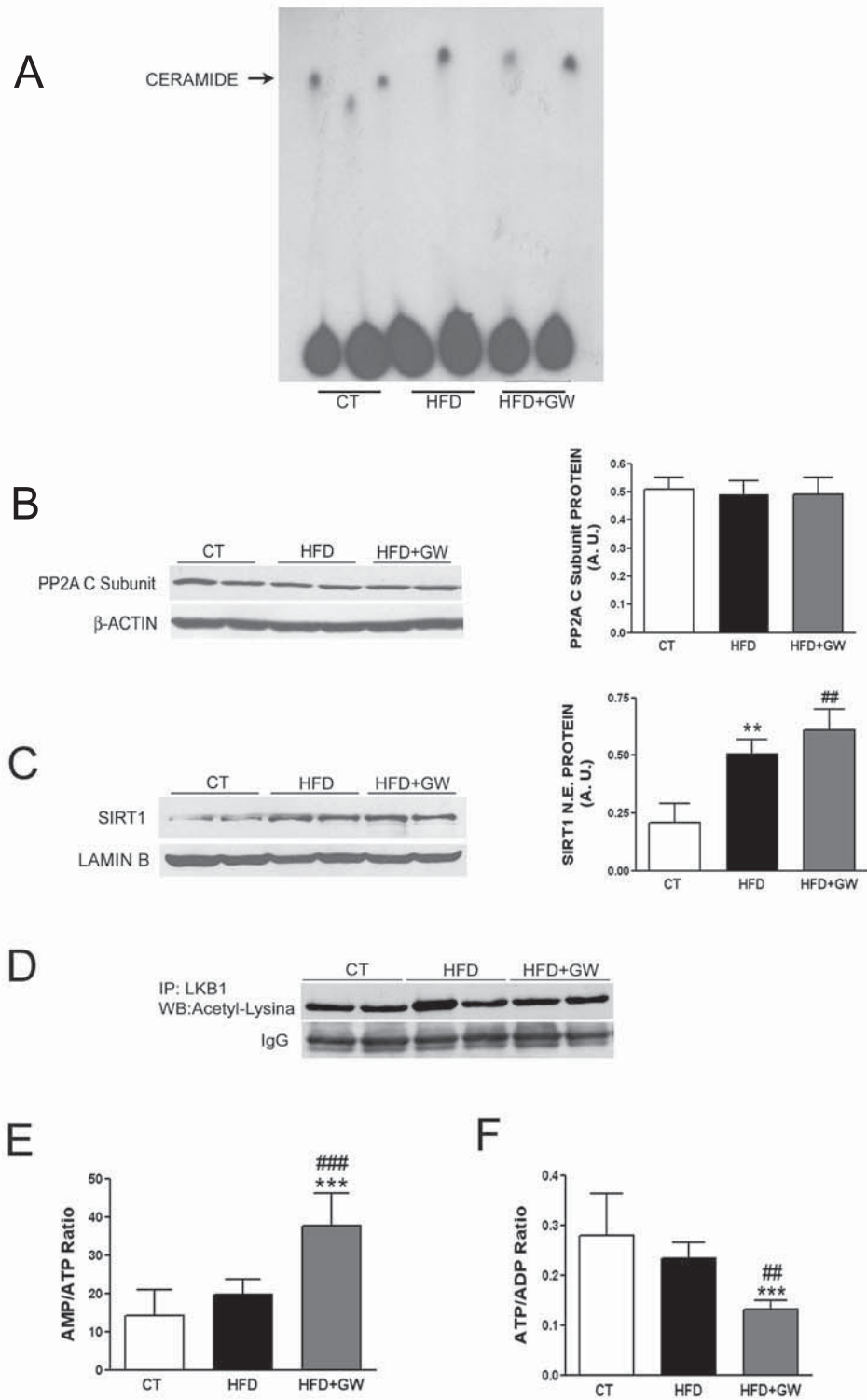


Figure 7.

**The Peroxisome Proliferator-Activated Receptor β/δ
(PPAR β/δ) Agonist GW501516 Prevents TNF- α -induced
NF- κ B Activation in Human HaCaT Cells by Reducing p65
Acetylation through AMPK and SIRT1**

Emma Barroso, Elena Eyre, Xavier Palomer i Manuel Vázquez-Carrera

Acceptat

Biochemical Pharmacology
(Índex d'impacte 4,25. Q1)

A les malalties inflamatòries de la pell, com la dermatitis atòpica i la psoriasi, els queratinòcits generen tota una sèrie de mediadors inflamatoris a través de l'activació del factor de transcripció NF- κ B. La forma més abundant de NF- κ B és la constituïda per l'heterodímer p50 i p65. En cèl·lules no estimulades, NF- κ B es troba segregat al citosol per la interacció amb les proteïnes inhibidores I κ B. Quan es produeix un estímul específic, com per exemple per increment dels nivells de la citoquina pro-inflamatòria TNF- α , les proteïnes I κ B són fosforilades pel complex I κ B quinasa (IKK) i són degradades pel sistema ubiquitina-proteasoma. Així, NF- κ B queda lliure i pot translocar-se al nucli on pot activar la transcripció dels seus gens diana. A més, la transactivació de NF- κ B es troba regulada per acetilació a múltiples lisines a través, principalment, de l'activitat acetiltransferasa del coactivador transcripcional p300. Aquesta acetilació regula diferents funcions de NF- κ B, incloent l'activació transcripcional, la unió a l'ADN, i l'assemblatge amb proteïnes I κ B de nova síntesi.

D'altra banda, l'activitat transcripcional de NF- κ B pot ser inhibida per proteïnes desacetilases, les sirtuïnes. De fet, s'ha demostrat que SIRT1 és un potent inhibidor de la transcripció de NF- κ B. És interessant destacar, que la proteïna AMPK millora l'activitat de SIRT1 i a més a més, pot fosforilar p300, inhibint la seva capacitat d'interaccionar amb els receptors nuclears com NF- κ B.

Recentment s'ha demostrat que activadors de PPAR α i PPAR β/δ milloren la simptomatologia de les malalties inflamatòries de la pell i redueixen la producció de citoquines, tot i que el seu mecanisme d'acció encara és desconegut.

L'objectiu del present estudi ha estat avaluar els efectes de l'agonista de PPAR β/δ GW501516 en l'activació de NF- κ B induïda per TNF- α en queratinòcits humans. Els resultats obtinguts mostren que l'activació de PPAR β/δ a través de GW501516 prevé l'expressió de diversos gens diana de NF- κ B i la seva capacitat d'unir-se a l'ADN, després de l'estimulació amb TNF- α . El mecanisme pel qual GW501516 redueix l'activitat NF- κ B pot implicar una reducció de l'acetilació de p65 induïda per TNF- α a través de l'activació d'AMPK. Aquest increment de l'activació de l'AMPK també augmentaria la fosforilació de p300, reduint la interacció entre p300 i p65, a més d'induir la desacetilació de p65 a través de SIRT1.



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical Pharmacology

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



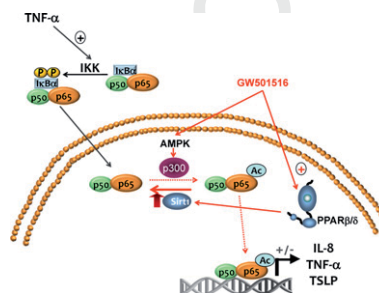
1

Graphical Abstract

The peroxisome proliferator-activated receptor β/δ (PPAR β/δ) agonist GW501516 prevents TNF- α -induced NF- κ B activation in human HaCaT cells by reducing p65 acetylation through AMPK and SIRT1

Emma Barroso, Elena Eyre, Xavier Palomer, Manuel Vázquez-Carrera*

pp: xxx–xxx



UNCORRECTED



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical Pharmacology

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

The peroxisome proliferator-activated receptor β/δ (PPAR β/δ) agonist GW501516 prevents TNF- α -induced NF- κ B activation in human HaCaT cells by reducing p65 acetylation through AMPK and SIRT1

Emma Barroso^{a,b}, Elena Eyre^{a,b}, Xavier Palomer^{a,b}, Manuel Vázquez-Carrera^{a,b,*}^a Department of Pharmacology and Therapeutic Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Institut de Biomedicina de la UB (IBUB), Spain^b CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas (CIBERDEM)-Instituto de Salud Carlos III, Diagonal 643, E-08028 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 October 2010

Accepted 1 December 2010

Available online xxx

ABSTRACT

Nuclear factor (NF)- κ B is a ubiquitously expressed transcription factor controlling the expression of numerous genes involved in inflammation. The aim of this study was to evaluate whether activation of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) β/δ prevented TNF- α -induced NF- κ B activation in human HaCaT keratinocytes and, if so, to determine the mechanism involved. The PPAR β/δ agonist GW501516 inhibited the increase caused by TNF- α in the mRNA levels of the NF- κ B target genes interleukin 8 (IL-8), TNF- α and thymic stromal lymphopoietin (TSLP). Likewise, GW501516 prevented the increase in NF- κ B DNA-binding activity observed in cells exposed to TNF- α . The reduction in NF- κ B activity following GW501516 treatment in cells stimulated with TNF- α did not involve either increased I κ B α protein levels or a reduction in the translocation of the p65 subunit of NF- κ B. In contrast, GW501516 treatment decreased TNF- α -induced p65 acetylation. Acetylation of p65 is mainly regulated by p300, a transcriptional co-activator that binds to and acetylates p65. Of note, AMP kinase (AMPK) activation phosphorylates p300 and reduces its binding to p65. GW501516 increased AMPK phosphorylation and the subsequent p300 phosphorylation, leading to a marked reduction in the association between p65 and this transcriptional co-activator. In addition, treatment with the PPAR β/δ agonist increased SIRT1 protein levels. Finally, the reduction in IL-8 mRNA levels following GW501516 treatment in TNF- α -stimulated cells was abolished in the presence of the PPAR β/δ antagonist GSK0660, the AMPK inhibitor compound C and the SIRT1 inhibitor sirtinol, indicating that the effects of GW501516 on NF- κ B activity were dependent on PPAR β/δ , AMPK and SIRT1, respectively.

© 2010 Published by Elsevier Inc.

1. Introduction

In inflammatory skin diseases, such as atopic dermatitis and psoriasis, keratinocytes can respond to various stimuli and produce inflammatory mediators (cytokines, chemokines) through activation of the ubiquitously expressed transcription factor nuclear factor κ B (NF- κ B). In mammals the NF- κ B/Rel family includes five known members: p50 (NF- κ B1), p52 (NF- κ B2), p65 (RelA), c-Rel, and RelB. The most abundant form of NF- κ B is a heterodimer consisting of p50 and p65. In unstimulated cells, NF- κ B is sequestered in the cytoplasm in an inactive form through

interaction with the I κ B inhibitory proteins. In the canonical activation pathway, stimulation of cells by specific stimuli, such as the proinflammatory cytokine tumor necrosis factor α (TNF α), results in phosphorylation of I κ B by the I κ B kinase (IKK) complex, leading to its degradation by the 26S proteasome. This releases NF- κ B, which then translocates to the nucleus, where it activates transcription of a wide variety of promoters [1].

In addition, it is now well established that NF- κ B-mediated transactivation is regulated by acetylation (for a review, see [2]). Thus, acetylation at multiple lysine residues in p65 and p50, which is mainly due to the intrinsic acetyltransferase activity of the transcriptional co-activator p300 [3–8], regulates different functions of NF- κ B, including transcriptional activation, DNA-binding affinity, and I κ B α assembly. Likewise, NF- κ B transcriptional activity can be inhibited by the NAD⁺-dependent protein deacetylases, sirtuins. Indeed, it has been reported that SIRT1, the most widely studied of the sirtuins, is a potent inhibitor of NF- κ B transcription [9,10]. Interestingly, AMP-activated protein kinase (AMPK) enhances SIRT1 activity [11] and phosphorylates

Abbreviations: AMPK, AMP-activated protein kinase; NF- κ B, nuclear factor κ B; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptors; SIRT1, silent information regulator T1; TNF α , tumor necrosis factor α .

* Corresponding author at: Unitat de Farmacologia, Facultat de Farmàcia, Diagonal 643, E-08028 Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 4024531; fax: +34 93 4035982.

E-mail address: mvazquezcarrera@ub.edu (M. Vázquez-Carrera).

0006-2952/\$ – see front matter © 2010 Published by Elsevier Inc.
doi:10.1016/j.bcp.2010.12.004

Please cite this article in press as: Barroso E, et al. The peroxisome proliferator-activated receptor β/δ (PPAR β/δ) agonist GW501516 prevents TNF- α -induced NF- κ B activation in human HaCaT cells by reducing p65 acetylation through AMPK and SIRT1. *Biochem Pharmacol* (2010), doi:10.1016/j.bcp.2010.12.004

40 p300, thus inhibiting its ability to interact with nuclear receptors
41 [12] such as NF- κ B.

42 Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are mem-
43 bers of the nuclear receptor superfamily of ligand-inducible
44 transcription factors that form heterodimers with retinoid X
45 receptors (RXRs) and bind to consensus DNA sites [13]. PPARs may
46 also suppress inflammation through various mechanisms, such as
47 reduced release of inflammatory factors or stabilization of
48 repressive complexes at inflammatory gene promoters [14–17].
49 Of the three PPAR isotypes found in mammals, i.e. PPAR α (NR1C1),
50 PPAR β/δ (NR1C2), and PPAR γ (NR1C3), considerable attention has
51 been paid to the role of PPAR β/δ in skin homeostasis (for a review,
52 see [18]). In the keratinocytes of human skin, PPAR β/δ is the
53 predominant PPAR isotype [19] and its expression is enhanced in
54 hyperproliferative lesional skin from psoriatic patients [19,20].
55 Interestingly, it has been recently reported that in skin inflamma-
56 tory diseases PPAR α and PPAR β/δ activators improve the disease
57 and decrease cytokine production, although the anti-inflammatory
58 mechanism involved was not reported [21]. In this study we
59 evaluated the effect of the PPAR β/δ agonist GW501516 on TNF- α -
60 induced NF- κ B activation in human keratinocytes. PPAR β/δ
61 activation by GW501516 prevented TNF- α -induced expression
62 of several NF- κ B target genes and the DNA-binding activity of this
63 proinflammatory transcription factor. The findings also demon-
64 strate that GW501516 reduces TNF- α -induced acetylation of the
65 p65 subunit of NF- κ B through AMPK activation, which increases
66 p300 phosphorylation, thereby reducing the p300 and p65
67 interaction and SIRT1-mediated p65 deacetylation.

68 2. Materials and methods

69 2.1. Materials

70 Human HaCaT cell line was obtained from ATCC. The PPAR β/δ
71 ligand GW501516 was from Biomol Research Labs Inc. (Plymouth
72 Meeting, PA). Other chemicals were from Sigma–Aldrich (St. Louis,
73 MO).

74 2.2. Cell culture

75 HaCaT cells were cultured in 150 cm² cell culture flasks at 37 °C,
76 5% CO₂ in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco
77 Invitrogen, Barcelona, Spain) containing 10% fetal bovine serum
78 (FBS) (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO) and penicillin G sodium,
79 streptomycin sulfate, and gentamicin (Gibco Invitrogen, Barcelona,
80 Spain). The cells received fresh medium every 2 days and were
81 subcultured every 4 days. Fortieth- to seventieth-passage cells
82 were used in all experiments. When confluence was achieved the
83 cells were trypsinized, washed, and resuspended in DMEM with
84 10% FBS. Cells were cultured on 60 mm culture dishes and when
85 they reached confluence the medium was replaced by DMEM
86 without FBS. Cells were preincubated with or without 1 μ M
87 GW501516 for 16 h and then stimulated with TNF- α (Sigma–
88 Aldrich, St. Louis, MO) for either 2 h (mRNA studies) or 30 min
89 (protein studies). Inhibitors (GSK0660, compound C, and sirtinol)
90 (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO) were added 30 min before the
91 incubation with GW501516. After the incubation, RNA, whole cell
92 lysates, and cytosolic and nuclear extracts were extracted from
93 cells as described below.

94 2.3. Measurements of mRNA

95 Levels of mRNA were assessed by the reverse transcription-
96 polymerase chain reaction (RT-PCR) as previously described [22].
97 Total RNA was isolated using the Ultraspec reagent (Biotecx,
98 Houston, TX). The total RNA isolated by this method is non-degraded

and free of protein and DNA contamination. The sequences of
the sense and antisense primers (Roche Diagnostics, Sant Cugat
del Vallés, Spain) used for amplification were: IL-8: 5'-ATGACTTC-
CAAGCTGGCCGTG-3' and 5'-GCGCAGTGTGGTCCACTCTCA-3'; TNF-
 α : 5'-AAGCTGAGGGGACAGTCCAGT-3' and 5'-TCTGGTAGGAGAC-
GGCGATGC-3'; thymic stromal lymphopoietin (TSLP): 5'-TAG-
CAATCGGCCACATTGCCT-3' and 5'-GAAGCGACGCCACAATCCTTG-
3'; and 18S: 5'-ATGACTTCCAAGCTGGCCGTG-3' and 5'-GCGC-
AGTGTGGTCCACTCTCA-3'. Amplification of each gene yielded a
single band of the expected size (IL-8: 185 bp; TNF- α : 204 bp; TSLP:
247 bp; and 18S: 333 bp). Preliminary experiments were carried out
with various amounts of cDNA to determine non-saturating
conditions of PCR amplification for all the genes studied. Therefore,
under these conditions, relative quantification of mRNA was
assessed by the RT-PCR method used in this study [23]. Radioactive
bands were quantified by video-densitometric scanning (Vilber
Lourmat Imaging, Marne-la-Vallée, France). The results for the
expression of specific mRNAs are always presented relative to the
expression of the control gene (18S).

2.4. Isolation of nuclear extracts

Nuclear extracts were isolated as previously described [24]. Cells
were scraped into 1.5 ml of cold phosphate-buffered saline, pelleted
for 10 s and resuspended in 400 μ l of cold Buffer A (10 mM HEPES
pH 7.9 at 4 °C, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.2 mM
PMSF, and 5 μ g/ml aprotinin) by flicking the tube. Cells were
allowed to swell on ice for 10 min and were then vortexed for 10 s.
Samples were subsequently centrifuged for 10 s and the supernatant
fraction was discarded. Pellets were resuspended in 50 μ l of cold
Buffer C (20 mM HEPES–KOH pH 7.9 at 4 °C, 25% glycerol, 420 mM
NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.2 mM PMSF,
5 μ g/ml aprotinin, and 2 μ g/ml leupeptin) and incubated on ice for
20 min for high-salt extraction. Cellular debris was removed by
centrifugation for 2 min at 4 °C and the supernatant fraction
(containing DNA-binding proteins) was stored at –80 °C. Nuclear
extract concentration was determined by the Bradford method.

2.5. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

EMSA was performed using double-stranded oligonucleotides
(Promega, Madison, WI) for the consensus binding site of the NF- κ B
nucleotide (5'-AGTTGAGGGGACTTCCAGGC-3'). Oligonucleotides
were labeled in the following reaction: 2 μ l of oligonucleotide
(1.75 pmol/ μ l), 2 μ l of 5 \times kinase buffer, 1 μ l of T4 polynucleotide
kinase (10 U/ μ l) (Gibco Invitrogen, Barcelona, Spain), and 2.5 μ l of
[γ -³²P] ATP (3000 Ci/mmol at 10 mCi/ml) (Perkin Elmer, Waltham,
MA), incubated at 37 °C for 1 h. The reaction was stopped by adding
90 μ l of TE buffer (10 mM Tris–HCl pH 7.4 and 1 mM EDTA). To
separate the labeled probe from the unbound ATP, the reaction
mixture was eluted in a Nick column (GE Healthcare, CA) following
the manufacturer's instructions. Eight micrograms of crude nuclear
protein were incubated for 10 min on ice in binding buffer (10 mM
Tris–HCl pH 8.0, 25 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.1 mM EDTA pH 8.0, 5%
glycerol, 5 mg/ml BSA, and 50 μ g/ml poly(di–dC)), in a final volume
of 15 μ l. Labeled probe (approximately 60,000 cpm) was added and
the reaction was incubated for 15 min at 4 °C (NF- κ B). Where
indicated, specific competitor oligonucleotide was added before the
labeled probe and incubated for 10 min on ice. Protein–DNA
complexes were resolved by electrophoresis at 4 °C on a 5%
acrylamide gel and subjected to autoradiography.

2.6. Antibodies, immunoprecipitation and immunoblotting

Antibodies against I κ B α , p65, PPAR β/δ , total and phospho-
p300 (Ser⁸⁹) (Santa Cruz Biotechnology, CA), SIRT1 (Millipore, MA),

HSP27 (R&D Systems, MN), total and phospho-ERK1/2 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴), total and phospho-AMPK (Thr¹⁷²), total and phospho-ACC (Ser⁷⁹), acetyl-lysine (Cell Signaling Technology Inc., MA), and β -actin (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO) were used.

Cytosolic and nuclear protein extracts were prepared as follows. Briefly, HaCaT cells grown in a 60 mm dish were rinsed with ice-cold PBS and scraped into a microfuge tube with 0.5 ml Tris–HCl (pH 7.4) containing 1 mM sodium orthovanadate, 10 μ M PMSF, 2 μ g/ml aprotinin, and 1 μ g/ml leupeptin. The cells were pelleted by centrifugation (15,000 \times g, 30 min at 4 °C) and both the pellet (P1) and the supernatant (S1) were processed. The cell pellet (P1) was resuspended in 0.5 ml of RIPA and homogenized in a dounce homogenizer with 20 strokes. This homogenate was incubated on ice for 30 min and then centrifuged at 13,000 \times g for 15 min at 4 °C, with the supernatant being saved as nuclear extract. The resulting supernatant (S1) was diluted with RIPA buffer at 25% and saved as cytosolic extract.

To obtain whole-cell lysates, cells were homogenized in RIPA buffer (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO) with phosphatase inhibitor (0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM sodium orthovanadate, and 5.4 μ g/ml aprotinin). The homogenate was centrifuged at 16,700 \times g for 30 min at 4 °C. Protein concentration was measured by the Bradford method.

Whole-cell lysates and nuclear extracts were mixed with various antibodies (as specified in “Section 3”) and protein A-coupled to agarose beads. Proteins from whole-cell lysates, cytosolic and nuclear extracts, and immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE and transferred to immobilized polyvinylidene difluoride membranes (Millipore, Bedford, MA) and blotted with various antibodies (as specified in “Section 3”). Detection was achieved using the ECL plus chemiluminescence kit (GE Healthcare, CA). The size of detected proteins was estimated using protein molecular-mass standards (Invitrogen, Barcelona, Spain).

2.7. Statistical analyses

Results are expressed as means \pm S.D. of five separate experiments. Significant differences were established by one-way ANOVA, using the GraphPad Instat program (GraphPad Software V2.03) (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). When significant variations were found, the Tukey–Kramer multiple comparison test was applied. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. PPAR β/δ activation prevents TNF- α -induced expression of proinflammatory cytokines in HaCaT cells by inhibiting NF- κ B

We first examined the effect of PPAR β/δ activation on the mRNA levels of three NF- κ B target genes. HaCaT cells were preincubated for 16 h in the absence or in the presence of 1 μ M GW501516, a selective ligand for PPAR β/δ with 1000-fold higher affinity toward PPAR β/δ than for PPAR α and PPAR γ [25], and then stimulated with 10 ng/ml of TNF- α for 2 h. TNF- α enhanced the expression of IL-8 and TNF- α , two well known NF- κ B-target genes [1], whereas in cells co-incubated with TNF- α plus GW501516 this increase was markedly reduced (Fig. 1A and B). Similarly, the increase caused by TNF- α in the expression of TSLP, a cytokine strongly implicated in the pathogenesis of atopic dermatitis [26] and which is under the control of NF- κ B [27], was prevented in cells co-incubated with TNF- α and the PPAR β/δ agonist (Fig. 1C).

To demonstrate that GW501516 prevented TNF- α -induced NF- κ B activation, we then performed an EMSA. The NF- κ B protein formed two main complexes when incubated with nuclear extracts (Fig. 1D). The specificity of the DNA-binding complexes was assessed in competition experiments by adding an excess of

unlabeled NF- κ B oligonucleotide. Cells exposed to TNF- α showed enhanced NF- κ B DNA-binding activity, whereas cells exposed to TNF- α and treated with GW501516 showed a marked reduction in binding. Addition of antibody against the p65 subunit of NF- κ B reduced the intensity of the bands, whereas an unrelated antibody against Oct-1 did not, thereby indicating that these bands consisted mainly of this subunit.

3.2. PPAR β/δ activation affects neither I κ B α protein levels nor p65 translocation in TNF- α -stimulated HaCaT cells

To investigate the mechanism responsible for the reduction of the TNF- α -mediated increase in proinflammatory cytokines by GW501516, we measured the protein levels of the NF- κ B inhibitor I κ B α , which is under the transcriptional control of PPARs [28]. Cells exposed to TNF- α showed a marked reduction in I κ B α protein levels (Fig. 2A). However, drug treatment did not affect this reduction. Next, we evaluated the effects of GW501516 on p65 translocation in cytosolic and nuclear extracts (Fig. 2B). In unstimulated cells, p65 localized mainly in the cytosol and translocated to the nucleus following TNF- α stimulation. GW501516 treatment did not influence the translocation of the p65 subunit of NF- κ B. Since we have previously reported that PPAR β/δ activation by GW501516 inhibited NF- κ B by reducing phospho-ERK1/2 levels [29], we analyzed the phosphorylation status of this kinase. TNF- α exposure caused a slight increase in phospho-ERK1/2 levels that it was unaffected by GW501516, thereby indicating that changes in the phosphorylation status of ERK1/2 were not involved in the effects of GW501516 (Fig. 2C). Additionally, given that Hsp27 down-regulation results in increased NF- κ B activity in keratinocytes [30], we measured the protein levels of this heat-shock protein. Neither TNF- α treatment nor GW501516 affected the levels of this protein, and therefore it is unlikely to be involved in the effects caused by GW501516 (Fig. 2D). One of the anti-inflammatory mechanisms of PPAR β/δ involves protein–protein interaction between PPAR β/δ and the p65 subunit of NF- κ B [31]. This association prevents NF- κ B from binding to its response element and thereby inhibits its ability to induce gene transcription, leading to a reduction in the expression of proinflammatory cytokines. To evaluate the contribution of this mechanism to the effects of GW501516 on NF- κ B activity the interaction of PPAR β/δ with p65 was determined by immunoprecipitation of nuclear extract proteins with antibody against p65 and analysis of PPAR β/δ in the complex by Western blot (Fig. 3A). PPAR β/δ co-precipitated with p65, but no changes were observed in cells treated with GW501516, suggesting that drug treatment did not affect this association.

3.3. PPAR β/δ activation reduces p65 acetylation in TNF- α -stimulated HaCaT cells

As stated above, acetylation of different lysines in p65 regulates different functions of NF- κ B, including transcriptional activation and DNA-binding affinity [2]. Therefore, we evaluated the effects of GW501516 on p65 acetylation by anti-p65 immunoprecipitation followed by anti-acetyl-lysine immunoblotting. As shown in Fig. 3B, TNF- α enhanced p65 acetylation, whereas in cells co-incubated with TNF- α plus GW501516 a marked reduction was observed. Based on the evidence that p300 acetyltransferase plays a major role in acetylation of p65 [3–8], we next determined whether p300 was involved in the inhibition of p65 acetylation caused by GW501516 in TNF- α -exposed cells. Acetylation of the p65 subunit of NF- κ B by p300 requires their physical interaction and recruitment of this co-activator is a key step linking changes in the expression of NF- κ B target genes in inflammatory processes [32,33]. Interestingly, phosphorylation of p300 at serine 89 by

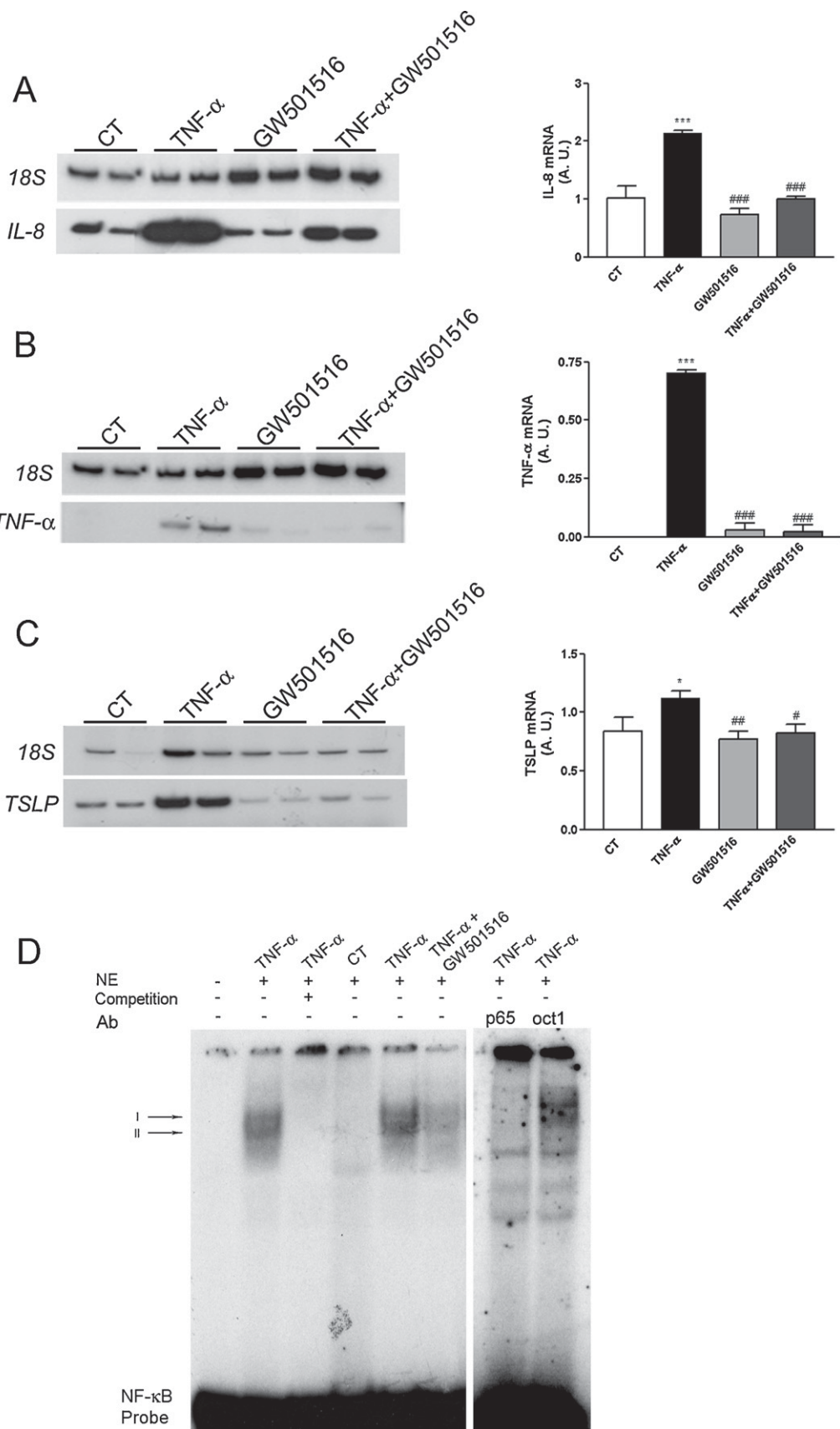


Fig. 1. The PPAR β/δ agonist GW501516 prevents TNF- α -induced cytokine expression and NF- κ B activation in HaCaT cells. Analysis of the mRNA levels of IL-8 (A), TNF- α (B) and TSLP (C) in HaCaT cells untreated or treated with 1 μ M GW501516 for 16 h before stimulation with 10 ng/ml TNF- α for 2 h. Total RNA was isolated and analyzed by RT-PCR. A representative autoradiogram is shown. Autoradiographs are representative of six separate experiments. (D) HaCaT cells were untreated or treated with 1 μ M GW501516 for 16 h before stimulation with 10 ng/ml TNF- α for 30 min. Autoradiograph of EMSA performed with a 32 P-labeled NF- κ B nucleotide and nuclear protein extracts (NE). Two specific complexes, based on competition with a molar excess of unlabeled probe, are shown. A supershift analysis performed

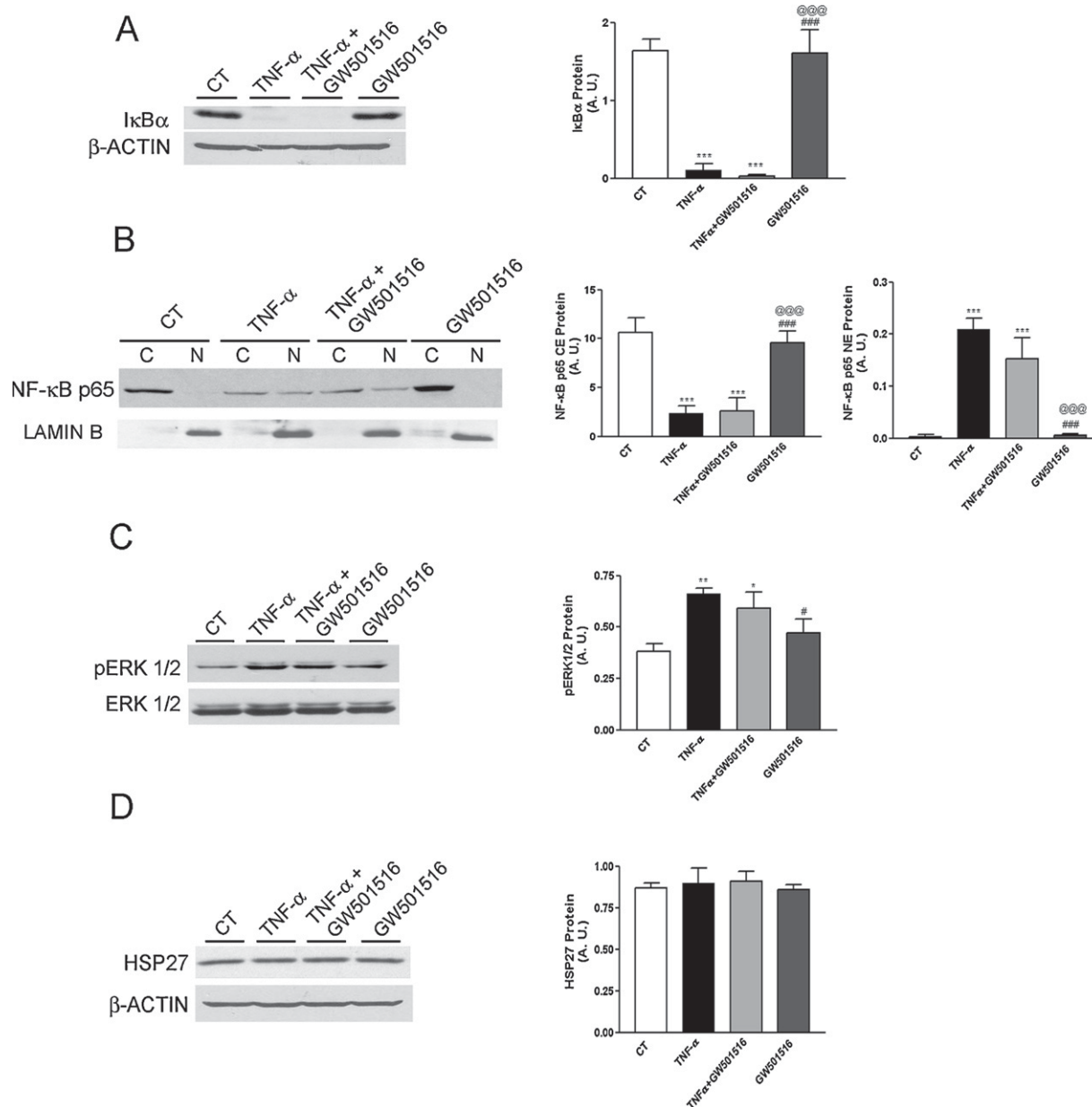


Fig. 2. The PPAR β/δ agonist GW501516 affects neither I κ B α protein levels nor the translocation of the p65 subunit of NF- κ B in HaCaT cells. HaCaT cells were untreated or treated with 1 μ M GW501516 for 16 h before stimulation with 10 ng/ml TNF- α for 30 min. (A) Protein levels of I κ B α protein extracts from HaCaT cells were assayed by Western blot analysis with I κ B α and β -actin antibodies. (B) Protein levels of p65 in cytosolic (C) and nuclear (N) extracts. (C) Protein levels of total and phospho-ERK1/2 protein extracts from HaCaT cells were assayed by Western blot analysis with total and phospho-ERK1/2 antibodies. (D) Protein levels of Hsp27. Protein extracts from HaCaT cells were assayed by Western blot analysis with Hsp27 and β -actin antibodies. The blot data are representative of three separate experiments. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 vs. control cells; # p < 0.05, ### p < 0.001 vs. TNF- α -exposed cells; @@@ p < 0.001 vs. TNF- α -exposed cells incubated with GW501516.

282 AMPK dramatically reduces its interaction with nuclear receptors
283 [12]. Thus, we first examined whether, as reported in skeletal
284 muscle cells [34], GW501516 increased phospho-AMPK levels in
285 HaCaT cells. Cells exposed to GW501516 showed higher phospho-
286 AMPK and phospho-acetyl-CoA carboxylase (ACC) levels, a
287 downstream molecular target of AMPK, than did those treated
288 with TNF- α (Fig. 4A and B). In agreement with the increase in
289 phospho-AMPK levels, GW501516 enhanced p300 phosphorylation
290 at serine 89 compared to TNF- α exposed cells (Fig. 4C).
291 Consistent with these findings, co-immunoprecipitation studies
292 showed that TNF- α enhanced the association between p65 and

p300 compared with unstimulated cells (Fig. 4D), which is in
agreement with previous studies [7], whereas GW501516 blocked
this interaction. Since histone deacetylases, such as SIRT1, can
reduce the acetylation level of the p65 protein and thereby inhibit
the activity of NF- κ B [8,9], and given the recent evidence that
PPAR β/δ activation can increase the expression of SIRT1 [35], we
examined the effect of GW501516 on SIRT1 protein levels.
Although GW501516 exposure for 16 h did not significantly
affect Sirt1 mRNA levels (data not shown), a treatment for
30 min significantly increased the protein levels of this deacetylase
(Fig. 5A). Finally, to confirm that the changes observed in cells

by incubating NE with an antibody directed against the p65 subunit of NF- κ B is also shown. Autoradiograph is representative of three separate experiments. * p < 0.05, *** p < 0.001 vs. control cells; # p < 0.05, ## p < 0.01 and ### p < 0.001 vs. TNF- α -exposed cells.

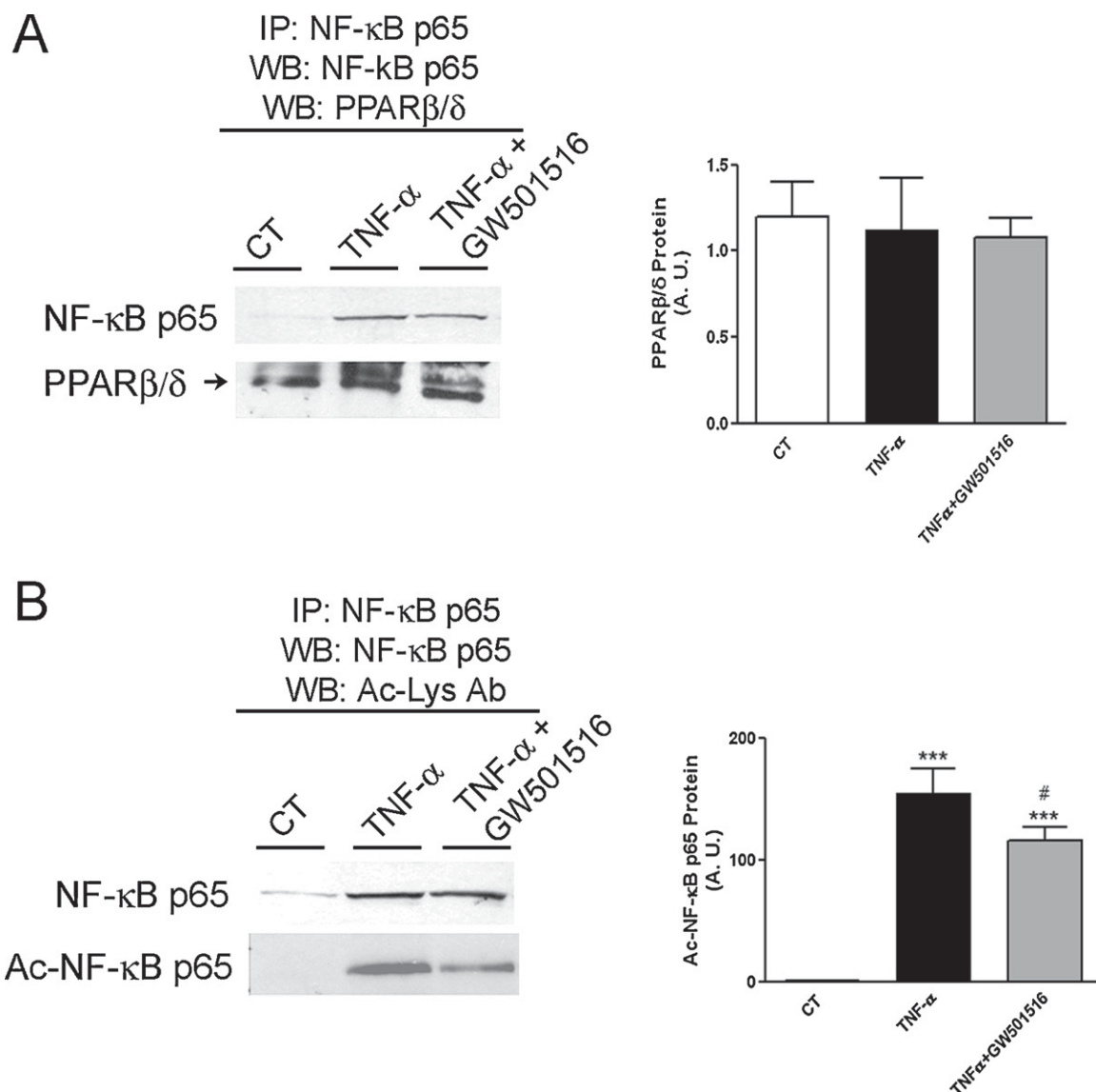


Fig. 3. The PPAR β/δ agonist GW501516 decreases acetylation of the p65 subunit of NF- κ B in HaCaT cells. HaCaT cells were untreated or treated with 1 μ M GW501516 for 16 h before stimulation with 10 ng/ml TNF- α for 30 min. (A) Nuclear extracts were immunoprecipitated (IP) with an antibody to the p65 subunit of NF- κ B and immunoblotted (IB) with an anti-PPAR β/δ antibody. (B) HaCaT cells were treated as described in (A). Immunoprecipitation was performed with an antibody to p65 and immunoblotted with an acetyl-lysine antibody. The blot data are representative of three separate experiments.

304 co-incubated with TNF- α and GW501516 were dependent on
305 PPAR β/δ , AMPK and SIRT1, we used the PPAR β/δ antagonist
306 GSK0660, the AMPK inhibitor compound C and the SIRT1 inhibitor
307 sirtinol. As shown in Fig. 5B, the inhibition of p65 acetylation
308 caused by GW501516 was slightly prevented by pretreatment
309 with GSK0660 and sirtinol and specially by compound C. Similarly,
310 GSK0660 and compound C prevented the reduction in the
311 association between p65 and p300 caused by GW501516
312 (Fig. 5C). Finally the inhibition of TNF- α -induced IL-8 and TSLP
313 expression caused by GW501516 were blocked by GSK0660,
314 compound C and sirtinol, indicating that the effects of GW501516
315 were PPAR β/δ -, AMPK- and SIRT1-dependent.

316 4. Discussion

317 Evidence has accumulated that acetylation and deacetylation
318 are implicated in the regulation of NF- κ B transcriptional activity.
319 Although these processes occur at different levels of the NF- κ B
320 signaling pathway, direct acetylation of the NF- κ B subunit p65
321 regulates different NF- κ B functions, including transcriptional

activation and DNA-binding affinity [2]. Among the acetyltrans-
322 ferases that can regulate NF- κ B activity through p65 acetylation a
323 major role is played by p300, a transcriptional co-activator with
324 acetyltransferase activity [3–8]. In addition, deacetylases can also
325 regulate NF- κ B activity. Thus, SIRT1 physically interacts with and
326 deacetylates the p65 subunit of NF- κ B and subsequently inhibits
327 NF- κ B transcriptional activity [9,36–38].

328
329 In this study we report that the PPAR β/δ agonist GW501516
330 inhibits TNF- α -induced cytokine expression through a mechanism
331 which involves reduced p65 acetylation. Our findings also show
332 that the anti-inflammatory effect of GW501516 is dependent on
333 both AMPK and SIRT1 activation. AMPK is a fuel-sensing enzyme
334 that responds to cellular energy depletion by increasing processes
335 that generate ATP and inhibiting others that require ATP but are
336 not acutely necessary for survival. Previous studies have demon-
337 strated that GW501516 increases AMPK activation/phosphoryla-
338 tion [34,39] in skeletal muscle cells by increasing the AMP:ATP
339 ratio [34,39]. Of note, AMPK can phosphorylate p300, inhibiting its
340 ability to interact with nuclear receptors [12]. In agreement with
341 this, GW501516 increased p300 phosphorylation and dramatically

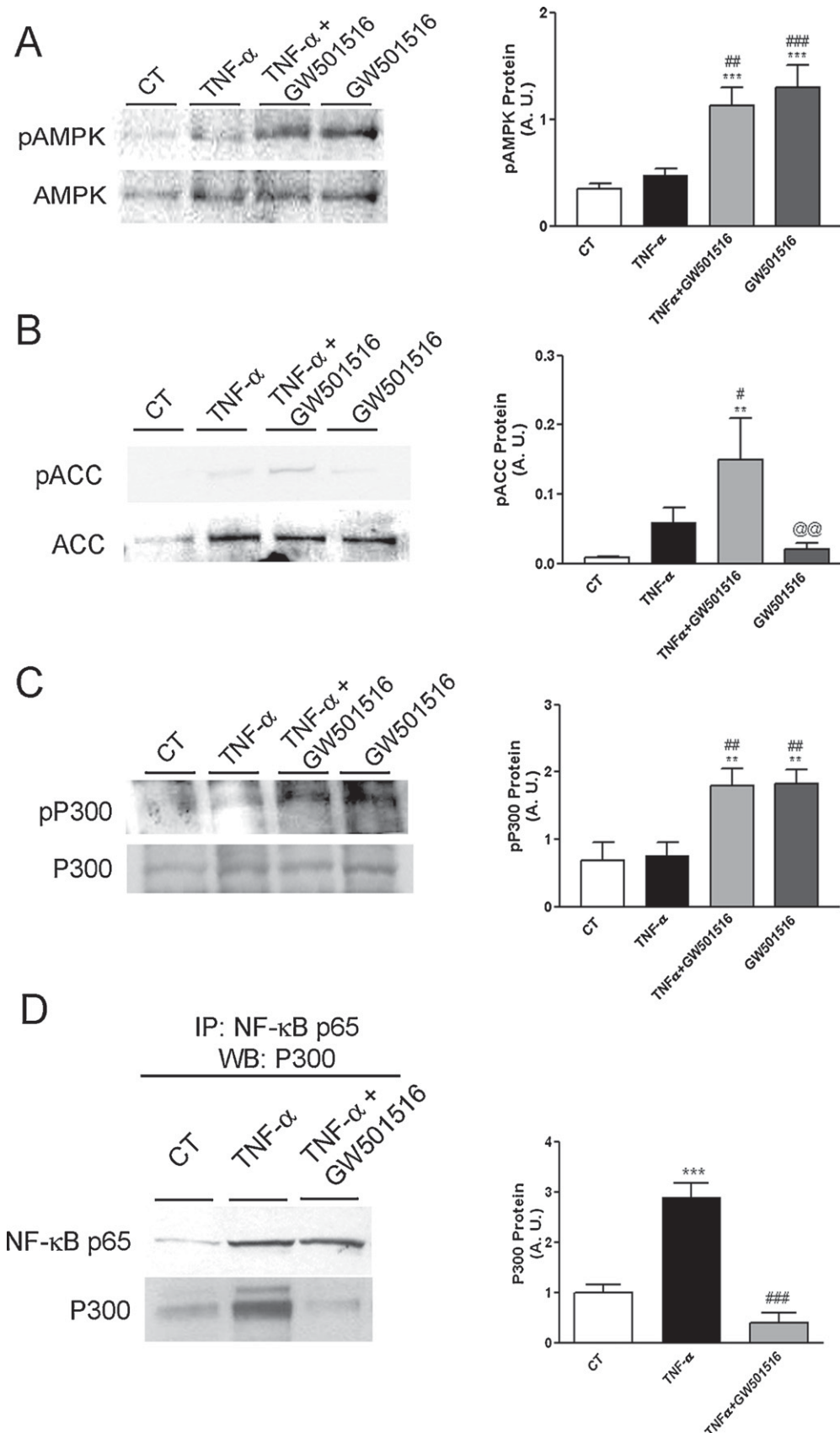


Fig. 4. The PPAR β/δ agonist GW501516 activates AMPK, phosphorylates p300 and prevents p65 and p300 association in HaCaT cells. HaCaT cells were untreated or treated with 1 μ M GW501516 for 16 h before stimulation with 10 ng/ml TNF- α for 30 min. Protein levels of total and phospho-AMPK (Thr¹⁷²) (A), phospho-ACC (Ser⁷⁹) (B) and total and phospho-p300 (Ser⁸⁹) (C). (D) Nuclear extracts were immunoprecipitated (IP) with an antibody to the p65 subunit of NF- κ B and immunoblotted (IB) with an anti-p300 antibody. The blot data are representative of three separate experiments. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. control cells; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs. TNF- α -exposed cells; @ $p < 0.01$ vs. TNF- α -exposed cells incubated with GW501516.

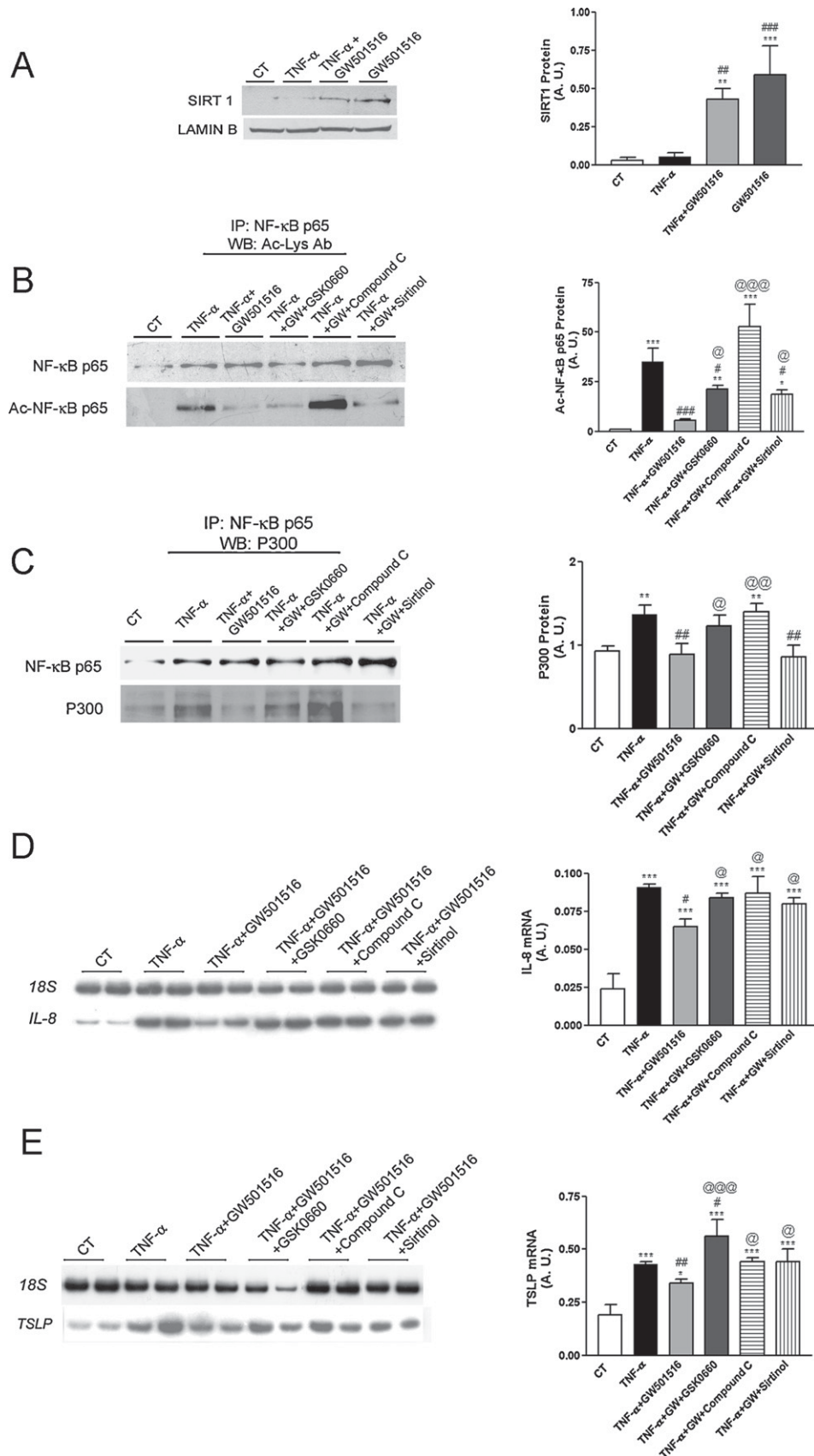


Fig. 5. The PPAR β/δ agonist GW501516 increases SIRT1 protein levels and the inhibition of TNF- α -induced cytokine expression by the PPAR β/δ agonist GW501516 is dependent on PPAR β/δ , AMPK and SIRT1 in HaCaT cells. (A) Protein levels of SIRT1. HaCaT cells were untreated or treated with 1 μ M GW501516 for 16 h before stimulation with 10 ng/ml TNF- α for 30 min. The blot data are representative of three separate experiments. (B) HaCaT cells were untreated or treated with 1 μ M GW501516 for 16 h in the presence or absence of GSK0660 (1 μ M), compound C (10 μ M), or sirtinol (20 μ M) before stimulation with 10 ng/ml TNF- α for 30 min. Immunoprecipitation was performed with an antibody to p65 and immunoblotted with an acetyl-lysine antibody. (C) HaCaT cells were treated as described in (B). Nuclear extracts were

reduced the association between p65 and p300. In addition, AMPK activation may enhance SIRT1 activity by increasing cellular NAD⁺ levels, resulting in the deacetylation and modulation of the activity of their target genes [11]. Moreover, a recent study demonstrated that PPAR β/δ regulates human SIRT1 gene transcription via Sp1 [35]. In agreement with this, we observed increased SIRT1 protein levels following PPAR β/δ agonist treatment. Indeed, several studies have indicated that SIRT1 is a potent inhibitor of NF- κ B transcription [9]. Finally, the involvement of SIRT1 in the effects attained by GW501516 was clearly demonstrated by using sirtinol, a known inhibitor of SIRT1, which abolished the reduction in IL-8 expression.

The results reported here conflict with previous studies reporting that PPARs do not repress NF- κ B dependent transactivation in human keratinocytes [19,40]. The reasons for this discrepancy might involve differences in the proinflammatory stimuli used (TNF- α vs. IL-1 β), the time exposure, and agonist concentration.

The present findings have implications for the potential treatment of skin inflammatory diseases with PPAR β/δ agonists. For instance, psoriasis has been characterized as an inflammatory disorder with enhanced production of cytokines in lesional psoriatic skin. Thus, in psoriatic epidermis NF- κ B binding to the κ B site of the IL-8 promoter is enhanced [41]. The use of a PPAR β/δ agonist may therefore improve the inflammatory process in this pathology. However, excessive PPAR β/δ activation in this context can be counterproductive since it has been demonstrated that activation of overexpressed PPAR β/δ in mice epidermis causes a psoriasis-like skin disease [42]. This is not surprising, since previous studies had already reported that overexpression of PPARs may result in deleterious effects. For instance, whereas PPAR α activation improves glycemic control in diabetic monkeys [43], overexpression of this nuclear receptor causes insulin resistance [44].

In atopic dermatitis, a chronic inflammatory dermatosis, administration of PPAR α and PPAR β/δ activators improved the disease and decreased cytokine production, although the anti-inflammatory mechanism involved was not reported [21]. Since NF- κ B inhibition can help ameliorate atopic dermatitis [45], the inhibition of this pro-inflammatory transcription factor resulting from activation of PPAR β/δ might be involved in these effects.

Overall, our findings indicate that GW501516 inhibits TNF- α induced cytokine expression through AMPK activation, which increases p300 phosphorylation, thereby reducing the p300 and p65 interaction and SIRT1-mediated p65 deacetylation. As a result, p65 acetylation, NF- κ B DNA-binding activity, and cytokine expression are all reduced following GW501516 treatment.

Acknowledgements

This study was supported by funds from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2006-01475 and SAF2009-06939) and European Union ERDF Funds. CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM) is a project of the Instituto de Salud Carlos III. We would like to thank the University of Barcelona's Language Advisory Service for its help.

References

- [1] Baldwin Jr AS. Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. *J Clin Invest* 2001;107:3–6.

- [2] Quivy V, Van LC. Regulation at multiple levels of NF-kappaB-mediated transactivation by protein acetylation. *Biochem Pharmacol* 2004;68:1221–9.
- [3] Kiernan R, Bres V, Ng RW, Coudart MP, El MS, Sardet C, et al. Post-activation turn-off of NF-kappa B-dependent transcription is regulated by acetylation of p65. *J Biol Chem* 2003;278:2758–66.
- [4] Chen LF, Mu Y, Greene WC. Acetylation of RelA at discrete sites regulates distinct nuclear functions of NF-kappaB. *EMBO J* 2002;21:6539–48.
- [5] Furia B, Deng L, Wu K, Baylor S, Kehn K, Li H, et al. Enhancement of nuclear factor-kappa B acetylation by coactivator p300 and HIV-1 Tat proteins. *J Biol Chem* 2002;277:4973–80.
- [6] Deng WG, Wu KK. Regulation of inducible nitric oxide synthase expression by p300 and p50 acetylation. *J Immunol* 2003;171:6581–8.
- [7] Deng WG, Zhu Y, Wu KK. Up-regulation of p300 binding and p50 acetylation in tumor necrosis factor-alpha-induced cyclooxygenase-2 promoter activation. *J Biol Chem* 2003;278:4770–7.
- [8] Chen LF, Greene WC. Regulation of distinct biological activities of the NF-kappaB transcription factor complex by acetylation. *J Mol Med* 2003;81: 549–57.
- [9] Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, Keller MD, Jones DR, Frye RA, et al. Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J* 2004;23:2369–80.
- [10] Chen J, Zhou Y, Mueller-Steiner S, Chen LF, Kwon H, Yi S, et al. SIRT1 protects against microglia-dependent amyloid-beta toxicity through inhibiting NF-kappaB signaling. *J Biol Chem* 2005;280:40364–7.
- [11] Canto C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, Lagouge M, Noriega L, Milne JC, et al. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature* 2009;458:1056–60.
- [12] Yang W, Hong YH, Shen XQ, Frankowski C, Camp HS, Leff T. Regulation of transcription by AMP-activated protein kinase: phosphorylation of p300 blocks its interaction with nuclear receptors. *J Biol Chem* 2001;276:38341–4.
- [13] Michalik L, Auwerx J, Berger JP, Chatterjee VK, Glass CK, Gonzalez FJ, et al. International union of pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol Rev* 2006;58:726–41.
- [14] Lee CH, Chawla A, Urbiztondo N, Liao D, Boisvert WA, Evans RM, et al. Transcriptional repression of atherogenic inflammation: modulation by PPAR-delta. *Science* 2003;302:453–7.
- [15] Pascual G, Fong AL, Ogawa S, Gamliel A, Li AC, Perissi V, et al. A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. *Nature* 2005;437:759–63.
- [16] Daynes RA, Jones DC. Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 2002;2:748–59.
- [17] Devchand PR, Keller H, Peters JM, Vazquez M, Gonzalez FJ, Wahli W. The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature* 1996;384:39–43.
- [18] Michalik L, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in skin health, repair and disease. *Biochim Biophys Acta* 2007;1771:991–8.
- [19] Westergaard M, Henningsen J, Johansen C, Rasmussen S, Svendsen ML, Jensen UB, et al. Expression and localization of peroxisome proliferator-activated receptors and nuclear factor kappaB in normal and lesional psoriatic skin. *J Invest Dermatol* 2003;121:1104–17.
- [20] Rivier M, Safonova I, Lebrun P, Griffiths CE, Ailhaud G, Michel S. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor subtypes during the differentiation of human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1998;111: 1116–21.
- [21] Hatano Y, Man MQ, Uchida Y, Crumrine D, Mauro TM, Feingold KR, et al. Murine atopic dermatitis responds to peroxisome proliferator-activated receptors alpha and beta/delta (but not gamma) and liver X receptor activators. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:160–9.
- [22] Jove M, Salla J, Planavila A, Cabrero A, Michalik L, Wahli W, et al. Impaired expression of NADH dehydrogenase subunit 1 and PPARgamma coactivator-1 in skeletal muscle of ZDF rats: restoration by troglitazone. *J Lipid Res* 2004;45:113–23.
- [23] Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques* 1999;26:112–5.
- [24] Coll T, Jove M, Rodriguez-Calvo R, Eyre E, Palomer X, Sanchez RM, et al. Palmitate-mediated downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha in skeletal muscle cells involves MEK1/2 and nuclear factor-kappaB activation. *Diabetes* 2006;55:2779–87.
- [25] Oliver Jr WR, Shenk JL, Snaith MR, Russell CS, Plunket KD, Bodkin NL, et al. A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:5306–11.
- [26] Miazgowiec MM, Headley MB, Larson RP, Ziegler SF. Thymic stromal lymphopoietin and the pathophysiology of atopic disease. *Expert Rev Clin Immunol* 2009;5:547–56.
- [27] Lee HC, Headley MB, Iseki M, Ikuta K, Ziegler SF. Cutting edge: inhibition of NF-kappaB-mediated TSLP expression by retinoid X receptor. *J Immunol* 2008;181:5189–93.
- [28] Delerive P, Gervois P, Fruchart JC, Staels B. Induction of IkappaBalpha expression as a mechanism contributing to the anti-inflammatory activities of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activators. *J Biol Chem* 2000;275:36703–7.

immunoprecipitated (IP) with an antibody to the p65 subunit of NF- κ B and immunoblotted (IB) with an anti-p300 antibody. HaCaT cells were untreated or treated with 1 μ M GW501516 for 16 h in the presence or absence of GSK0660 (1 μ M), compound C (10 μ M), or sirtinol (20 μ M) before stimulation with 10 ng/ml TNF- α for 2 h. Analysis of the mRNA levels of IL-8 (D) and TSLP (E) in HaCaT cells. 0.5 μ g of total RNA was analyzed by RT-PCR. A representative autoradiogram normalized to 18S mRNA levels is shown. Data are expressed as mean \pm S.D. of six experiments. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 vs. control cells; [#] p < 0.05, ^{##} p < 0.01, ^{###} p < 0.001 vs. TNF- α -exposed cells. [@] p < 0.05, ^{@@} p < 0.01 vs. cells co-incubated with TNF- α and GW501516.

- [29] Rodriguez-Calvo R, Serrano L, Coll T, Moullan N, Sanchez RM, Merlos M, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta inhibits lipopolysaccharide-induced cytokine production in adipocytes by lowering nuclear factor-kappaB activity via extracellular signal-related kinase 1/2. *Diabetes* 2008;57:2149–57.
- [30] Sur R, Lyte PA, Southall MD. Hsp27 regulates pro-inflammatory mediator release in keratinocytes by modulating NF-kappaB signaling. *J Invest Dermatol* 2008;128:1116–22.
- [31] Planavila A, Rodriguez-Calvo R, Jove M, Michalik L, Wahli W, Laguna JC, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta activation inhibits hypertrophy in neonatal rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 2005;65:832–41.
- [32] Gerritsen ME, Williams AJ, Neish AS, Moore S, Shi Y, Collins T. CREB-binding protein/p300 are transcriptional coactivators of p65. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:2927–32.
- [33] Perkins ND, Felzien LK, Betts JC, Leung K, Beach DH, Nabel GJ. Regulation of NF-kappaB by cyclin-dependent kinases associated with the p300 coactivator. *Science* 1997;275:523–7.
- [34] Coll T, varez-Guardia D, Barroso E, Gomez-Foix AM, Palomer X, Laguna JC, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- Δ by GW501516 prevents fatty acid-induced nuclear factor- κ B activation and insulin resistance in skeletal muscle cells. *Endocrinology* 2010;151:1560–9.
- [35] Okazaki M, Iwasaki Y, Nishiyama M, Taguchi T, Tsugita M, Nakayama S, et al. PPARbeta/delta regulates the human SIRT1 gene transcription via Sp1. *Endocr J* 2010;57:403–13.
- [36] Csiszar A, Labinsky N, Podlutzky A, Kaminski PM, Wolin MS, Zhang C, et al. Vasoprotective effects of resveratrol and SIRT1: attenuation of cigarette smoke-induced oxidative stress and proinflammatory phenotypic alterations. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;294:H2721–35.
- [37] Yang SR, Wright J, Bauter M, Seweryniak K, Kode A, Rahman I. Sirtuin regulates cigarette smoke-induced proinflammatory mediator release via RelA/p65 NF-kappaB in macrophages in vitro and in rat lungs in vivo: implications for chronic inflammation and aging. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;292: L567–76.
- [38] Yoshizaki T, Milne JC, Imamura T, Schenk S, Sonoda N, Babendure JL, et al. SIRT1 exerts anti-inflammatory effects and improves insulin sensitivity in adipocytes. *Mol Cell Biol* 2009;29:1363–74.
- [39] Kramer DK, Al-Khalili L, Guigas B, Leng Y, Garcia-Roves PM, Krook A. Role of AMP kinase and PPARdelta in the regulation of lipid and glucose metabolism in human skeletal muscle. *J Biol Chem* 2007;282:19313–20.
- [40] Aarenstrup L, Flindt EN, Otkjaer K, Kirkegaard M, Andersen JS, Kristiansen K. HDAC activity is required for p65/RelA-dependent repression of PPARdelta-mediated transactivation in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2008;128:1095–106.
- [41] Johansen C, Flindt E, Kragballe K, Henningsen J, Westergaard M, Kristiansen K, et al. Inverse regulation of the nuclear factor-kappaB binding to the p53 and interleukin-8 kappaB response elements in lesional psoriatic skin. *J Invest Dermatol* 2005;124:1284–92.
- [42] Romanowska M, Reilly L, Palmer CN, Gustafsson MC, Foerster J. Activation of PPARbeta/delta causes a psoriasis-like skin disease in vivo. *PLoS ONE* 2010;5: e9701.
- [43] Wagner JD, Shadoan MK, Zhang L, Ward GM, Royer LJ, Kavanagh K, et al. A selective peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist, CP-900691, improves plasma lipids, lipoproteins, and glycemic control in diabetic monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* 2010;333:844–53.
- [44] Park SY, Cho YR, Finck BN, Kim HJ, Higashimori T, Hong EG, et al. Cardiac-specific overexpression of peroxisome proliferator-activated receptor- α causes insulin resistance in heart and liver. *Diabetes* 2005;54:2514–24.
- [45] Tanaka A, Muto S, Jung K, Itai A, Matsuda H. Topical application with a new NF-kappaB inhibitor improves atopic dermatitis in NC/NgaTnd mice. *J Invest Dermatol* 2007;127:855–63.

509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540

DISCUSSIÓ GLOBAL

Nombroses evidències mostren l'important paper dels receptors nuclears PPAR en el control de l'homeòstasi energètica a través de les seves accions reguladores sobre el metabolisme lipídic i glucídic, a més de la seva implicació en processos inflamatoris, tumorals i en la reproducció i el desenvolupament embrionari (Michalik i col. 2004; Desvergne i col. 2006; Rizzo i Fiorucci, 2006; Yessoufou i Wahli, 2010). Així, aquests efectes, observats tant en estudis *in vivo* com *in vitro*, han portat al desenvolupament de fàrmacs agonistes de PPAR per a la prevenció de patologies relacionades amb aquests processos.

La falta de lligands específics de PPAR β/δ fins fa relativament poc ha fet que els efectes fisiològics d'aquest subtipus hagin estat poc estudiats en relació als altres subtipus de PPAR, PPAR α i PPAR γ . Actualment però, la disponibilitat d'agonistes selectius de PPAR β/δ com GW501516, ha ajudat a conèixer i entendre l'important paper fisiològic que juga aquest receptor com regulador de múltiples funcions cel·lulars (Wagner i Wagner, 2010), especialment en la regulació del metabolisme (Oliver i col. 2001; Risérus i col. 2008; Grimaldi, 2010) i la resposta inflamatòria (Bishop-Bailey i Bystrom, 2009). Encara, però, resta per determinar els mecanismes moleculars responsables d'aquets efectes provocats per l'administració d'aquests fàrmacs, ja que només han estat parcialment estudiats. Els resultats presentats en aquesta tesi doctoral pretenen contribuir al coneixement dels mecanismes implicats en les funcions reguladores de PPAR β/δ sobre el metabolisme lipídic al fetge, en un model murí alimentat amb una dieta rica en greixos i sobre la resposta inflamatòria en queratinòcits humans.

1. L'activació de PPAR β/δ prevé la reducció de l'AMPK al fetge causada per una dieta rica en greixos i amplifica la via PGC1- α -Lipina 1-PPAR α , afavorint l'oxidació dels àcids grassos.

El fetge és un dels teixits més importants en la regulació de l'homeòstasi energètica degut al seu paper en el manteniment de la disponibilitat d'energia a través de les vies anabòliques i catabòliques. El consum excessiu de greixos pot produir un desequilibri en el metabolisme lipídic hepàtic resultant en una accelerada producció i alliberament de lipoproteïnes, alteració associada al desenvolupament de trastorns metabòlics com l'obesitat, la resistència a la insulina i el síndrome metabòlic. La utilització de l'agonista de PPAR β/δ GW501516 ha demostrat en diversos estudis animals (Oliver i col., 2001) i, fins i tot en humans (Risérus i col., 2008), l'efecte hipotrigliceremiant d'aquest fàrmac, el que suggeria que podria ser útil pel tractament d'aquests trastorns. En aquets estudi es va avaluar l'efecte de l'activador de PPAR β/δ GW501516 sobre els animals alimentats amb la HFD per aprofundir en els mecanismes responsables del seu efecte hipotrigliceremiant i, en concret, en la seva capacitat per a regular la β -oxidació dels àcids grassos al fetge. Cal mencionar que el principal factor responsable de la secreció hepàtica de triglicèrids és la disponibilitat d'àcids grassos (Lewis, 1997) i, en conseqüència, un increment de la β -oxidació reduiria la seva disponibilitat per a sintetitzar i secretar triglicèrids. A més, diversos estudis han demostrat que l'activació de PPAR β/δ pot incrementar el catabolisme d'àcids grassos a altres teixits també importants en el metabolisme energètic com el múscul esquelètic (Tanaka i col., 2003) i el teixit adipós (Wang i col., 2003), però hi ha poca informació sobre els efectes dels agonistes PPAR β/δ sobre la β -oxidació hepàtica i els possibles mecanismes implicats.

A diferència de la majoria d'estudis on l'exposició a la HFD és a més llarg termini (14-18 setmanes), al nostre estudi els ratolins van ser alimentats amb una HFD durant un període curt (3 setmanes) per observar millor els canvis inicials que produeixen el desequilibri metabòlic causat per aquesta dieta.

L'administració de la HFD va causar en els nostres ratolins hipertrigliceridèmia i intolerància a la glucosa però no es van observar canvis significatius en els nivells plasmàtics d'àcids grassos lliures, leptina o adiponectina, fet que indicava que en les nostres condicions la HFD no va induir senyals derivades del teixit adipós que interferissin sobre el metabolisme hepàtic. En canvi, els resultats van mostrar que el tractament amb GW501516 era capaç d'evitar el desenvolupament de la hipertrigliceridèmia causada per la HFD. Tanmateix, es va observar una millora en la sensibilitat a la insulina en els ratolins tractats amb l'agonista de PPAR β/δ , coincidint amb estudis previs (Lee i col., 2006).

Els ratolins alimentats amb la HFD van mostrar una reducció dels nivells hepàtics de l'AMPK fosforilada, proteïna responsable de la regulació de molts processos fisiològics, entre ells el catabolisme dels àcids grassos. Aquesta reducció induïda per la dieta rica en greixos, es va revertir per l'administració de GW501516. Igualment, la HFD també va reduir els nivells de Lipina1 i PGC1- α , ambdues proteïnes implicades en el control hepàtic de la secreció de triglicèrids i la β -oxidació. En estudis previs ja havia estat descrit que aquesta disminució de PGC1- α i Lipina 1 produïda per la HFD pot disminuir el procés de β -oxidació (Zhang i col., 2004) i augmentar la secreció hepàtica de triglicèrids (Chen i col., 2008), fets que afavoreixen l'aparició d'hipertrigliceridèmia.

D'altra banda, la recuperació dels nivells de la fosforilació de l'AMPK produïda per l'administració de GW501516 va anar acompanyada d'un augment de l'expressió de Lipina 1 i de PGC1- α i de l'expressió gènica del receptor de les VLDL. Tot i que l'activació d'aquets gens podria estar mitjançada directament per PPAR β/δ , també s'ha demostrat que l'activació de l'AMPK regula l'expressió de Lipina 1 (Higashida i col., 2008), de PGC1- α (Lee i col., 2006) i del receptor de les VLDL (Zenimaru i col., 2008). En conseqüència, la recuperació dels nivells de l'AMPK en els animals tractats amb GW501516 podria ser el punt clau responsable dels efectes d'aquest fàrmac a nivell hepàtic.

Aquest increment de l'AMPK produït pel tractament amb GW501516 pot ser el resultat de diversos mecanismes. D'una banda, l'administració de l'agonista de

DISCUSSION GLOBAL

PPAR β/δ va revertir l'augment de la fosforilació d'ERK1/2 causat per la HFD, quinasa que pot inhibir la fosforilació de l'AMPK (Du i col., 2008). De fet, donat que l'augment de l'AMPK i la reducció dels nivells d'ERK1/2 milloren la sensibilitat a la insulina (Zheng i col., 2009), aquests canvis podrien explicar en part l'efecte del GW501516 sobre aquest paràmetre. D'altra banda l'augment de l'AMPK podria ser causat també per l'activació de la desacetilasa SIRT1, que regula l'AMPK a través de la desacetilació de LKB1 (Hou i col., 2008). De fet, s'ha demostrat que l'activació de PPAR β/δ incrementa l'expressió de SIRT1 (Okazaki i col., 2010). Malgrat aquesta possibilitat, en el nostre estudi no vam observar canvis en l'acetilació de LKB1 que poguessin explicar l'activació de l'AMPK, tot i que els nivells proteics de SIRT1 es trobaven augmentats respecte als controls tant en els ratolins que van rebre la HFD com en els que van ser tractats amb la dieta grassa i el GW501516. Finalment, l'augment de l'AMPK al nostre estudi es pot explicar per l'increment de la relació AMP/ATP observat al fetge com a conseqüència de l'administració de GW501516. De fet, estudis previs indiquen que GW501516 pot interferir a la cadena respiratòria produint una reducció de la producció d'ATP (Kramer i col., 2007), fet que afavoriria l'augment de la relació AMP/ATP, permetent l'activació de l'AMPK.

Com s'ha explicat anteriorment, la proteïna AMPK es troba lligada a l'activació de gens responsables de la β -oxidació dels àcids grassos. Estudis al múscul esquelètic, han mostrat una relació entre l'activació de l'AMPK i la Lipina-1 que provoca un increment de l'expressió de gens implicats en l'oxidació dels àcids grassos (Higashida i col., 2008). A més, la Lipina 1 pot actuar com a coactivador transcripcional interaccionant directament amb receptors nuclears com PPAR α i PGC1- α , activant així gens implicats en la fosforilació oxidativa mitocondrial i d'àcids grassos (Finck i col., 2006). En el nostre estudi el tractament amb GW501516, en consonància amb la recuperació dels nivells de l'AMPK, va prevenir la reducció de PGC1- α i va incrementar els nivells de proteïna nuclear de Lipina 1 permetent l'amplificació de la via PGC1- α -PPAR α , fet que es demostra tant per l'augment de l'expressió gènica com de l'activitat d'unió a l'ADN de PPAR α . A més, el tractament amb GW501516 va augmentar l'expressió d'una sèrie de gens diana de PPAR α implicats en la β -oxidació d'àcids grassos com són la MCAD, la CTE i la CPT-1. Tanmateix, el tractament farmacològic va

augmentar els nivells plasmàtics de β -hidroxibutirat, un dels productes finals de la β -oxidació hepàtica. D'altra banda, l'activació de PPAR α també pot ser conseqüència d'un augment dels nivells dels seus lligands endògens com és el 16:0/18:1-PC, els nivells nuclears del qual estaven incrementats en el fetge dels animals tractats amb GW501516. Finalment, totes aquestes dades mostren que l'agonista de PPAR β/δ GW501516 prevé la reducció de l'AMPK, de PGC1- α i de la Lipina 1, amplifica la via PPAR α i augmenta la β -oxidació d'àcids grassos, canvis que poden contribuir a reduir la secreció hepàtica de triglicèrids i, en conseqüència, els nivells plasmàtics de triglicèrids.

Sorprenentment, i en contradicció amb l'augment de la β -oxidació d'àcids grassos, els animals tractats amb GW501516 presentaven una acumulació hepàtica de triglicèrids similar a la dels animals que només van rebre la HFD. Aquesta acumulació de lípids es pot explicar per diverses raons. En primer lloc, ha estat demostrat que la sobreexpressió hepàtica de Lipina 1 redueix la secreció de triglicèrids, segrestant-los al fetge (Finck i col., 2006). Això és degut a que la Lipina 1, a més de la seva implicació en l'amplificació de la via PPAR α per activar la β -oxidació, pot representar altres efectes com la reducció de la secreció de triglicèrids, l'increment de la captació d'àcids grassos o l'activitat PAP de la Lipina 1 (Finck i col., 2006), fets tots aquests que poden afavorir l'acumulació hepàtica de triglicèrids. Per tant, és possible que la recuperació dels nivells de Lipina 1 aconseguit pel GW501516 provoqués algun d'aquests efectes. D'altra banda, tal com ja s'ha comentat anteriorment, el tractament amb GW501516 va incrementar els nivells del receptor de les VLDL. Aquest increment podria contribuir a l'efecte hipotrigliceremiant del GW501516 ja que podria incrementar la captació de VLDL del plasma, retirant-les de la circulació sanguínia pel seu emmagatzematge o oxidació al fetge. Finalment, una altra raó que pot explicar l'acumulació de triglicèrids hepàtics podria ser la capacitat de GW501516 per a induir la síntesis d'àcids grassos a partir de glucosa al fetge, tal com ha estat demostrat per Lee i col. (2006). En aquest mateix estudi però, els autors assenyalen que tot i observar-se acumulació de triglicèrids hepàtics a ratolins *db/db* alimentats amb una dieta rica en greixos i carbohidrats i tractats amb GW501516 durant dues setmanes, no es van observar signes de fetge gras després de sis mesos de tractament amb l'agonista PPAR β/δ . Aquest fet fa pensar que a llarg termini la β -oxidació hepàtica activada per GW501516

DISCUSSION GLOBAL

no només seria capaç de reduir els triglicèrids circulants sinó també els acumulats al fetge. A més, recentment s'ha demostrat que l'activació de PPAR β/δ al fetge produeix acumulació de lípids, però aquests àcids grassos que s'acumulen són majoritàriament àcids grassos monoinsaturats, en detriment dels àcids grassos saturats, de manera que aquest fàrmac està reduint els nivells hepàtics d'àcids grassos molt més lipotòxics i parcialment responsables dels efectes perjudicials de l'esteatosi hepàtica per inducció de l'estrès oxidatiu (Liu i col., 2010).

II. *L'agonista de PPAR β/δ , GW501516, prevé l'activació de NF- κ B induïda per TNF- α per reducció de l'acetilació de p65 a través de l'AMPK i SIRT1 en cèl·lules humanes HaCaT.*

A més dels efectes sobre el metabolisme, els PPARs són importants reguladors de la resposta inflamatòria. Nombroses evidències en ratolins PPAR β/δ ^{-/-} indiquen que PPAR β/δ juga un paper rellevant en els processos inflamatoris, incloent-hi aquells que afecten a la pell (Barish, 2006). De fet, PPAR β/δ és el subtipus predominant als queratinòcits humans (Weestergaard i col., 2003), les cèl·lules majoritàries de l'epidermis que en cas d'inflamació i producció de citoquines poden desenvolupar malalties de la pell com la psoriasi o la dermatitis atòpica. En el cas de la dermatitis atòpica, l'administració d'activadors de PPAR α i PPAR β/δ sembla millorar la simptomatologia de la malaltia i disminueix la producció de citoquines (Hatano i col., 2010), però el mecanisme d'acció implicat no es coneix amb exactitud. En aquest estudi vam avaluar l'efecte antiinflamatori de l'agonista de PPAR β/δ GW501516 sobre queratinòcits humans exposats a un estímul pro-inflamatori com és el TNF- α .

Una de les citoquines que s'expressa de manera abundant als queratinòcits de les lesions de la pell de pacients amb dermatitis atòpica i que, a més, ha demostrat tenir un paper important en el desenvolupament de la resposta inflamatòria d'aquesta malaltia és la citoquina TSLP (*Thymic stromal lymphopoietin*) (He i Geha, 2010). Aquesta citoquina es troba també involucrada en altres processos inflamatoris com

l'asma (Demehri i col., 2009) i a algunes malalties autoimmunes com per exemple la psoriasi (Guttman-Yassky i col., 2007). La TSLP és un gen diana del factor nuclear κB i la seva producció i secreció es pot induir per estímuls externs com traumes, infeccions per microorganismes i al·lèrgens o per mediadors inflamatoris com IL-1 β i TNF- α (He i Geha, 2010). En general, la TSLP induïx la resposta inflamatòria Th2, incrementant la producció de citocines pro-inflamatòries Th2, a més de la polarització de les cèl·lules dendrítiques i la proliferació de les cèl·lules T (He i Geha, 2010). Així, tenint en compte que la TSLP és una de les citocines responsables del desenvolupament dels trastorns inflamatoris a la pell, vam decidir estudiar l'expressió d'aquesta citocina juntament amb l'expressió de la IL-8 i TNF- α , citocines també involucrades en el procés inflamatori. Els resultats van mostrar que el fàrmac GW501516 era capaç de reduir l'expressió d'aquestes citocines, induïdes per l'administració de TNF- α , mitjançant la reducció de l'activitat de NF- κB a través d'un mecanisme que sembla implicar la reducció de l'acetilació de la subunitat p65 a través de l'AMPK i SIRT1.

Com ja s'ha comentat anteriorment, l'AMPK és una proteïna que respon a l'estat energètic de la cèl·lula i que es troba activa quan augmenta la relació AMP/ATP. Estudis previs han demostrat que l'activació de PPAR β/δ interfereix d'alguna manera a la cadena respiratòria i a la producció d'ATP incrementant la relació AMP/ATP i induint l'activació de l'AMPK (Kramer i col., 2007). En cèl·lules HaCaT l'administració de GW501516 va augmentar els nivells de l'AMPK fosforilada evidenciant la seva activació, fet que coincidia amb els efectes de GW501516 observats a hepatòcits presentats en el primer estudi d'aquesta tesi doctoral. És interessant destacar que l'activitat de NF- κB es pot regular per acetilació a través del coactivador p300 i que en aquest procés pot participar-hi l'AMPK. Aquest coactivador p300 és un enzim amb activitat HAT que interacciona directament amb NF- κB i que pot acetilar la subunitat p65 a múltiples lisines (Chen i Green, 2003). L'acetilació d'aquests residus de lisina millora la capacitat d'unió de p65 amb l'ADN i evita l'exportació de NF- κB del nucli per unió amb I κB . Més concretament, l'acetilació de la Lys 310 de p65, aconsegueix l'activitat transcripcional màxima de NF- κB (Chen i Green, 2003 i 2005). No obstant, quan p300 es troba fosforilat està inhibit i la interacció amb NF- κB no es produeix, evitant-se així l'acetilació dels residus lisina. Estudis previs han demostrat que l'AMPK

DISCUSSION GLOBAL

és capaç de fosforilar la p300, inhibint la seva interacció amb NF- κ B (Yang i col., 2010). Al nostre estudi l'augment de la fosforilació de l'AMPK va anar acompanyada d'un augment de la fosforilació de p300, fet que suggeria la inhibició de la interacció entre aquest coactivador i NF- κ B, així com una reducció del grau d'acetilació de NF- κ B. Aquesta possibilitat es va demostrar amb els estudis de coimmunoprecipitació de p65 i p300 i amb els dels nivells d'acetilació de p65. Així doncs, la inhibició de NF- κ B causada per GW501516 en cèl·lules estimulades amb TNF- α podria ser parcialment deguda a l'activació de l'AMPK. Aquesta quinasa provocaria la fosforilació de la p300, reduint així la interacció d'aquest coactivador amb la subunitat p65 de NF- κ B, fet que a la vegada portaria a una reducció de l'acetilació de NF- κ B.

D'altra banda, la intensitat de la resposta inflamatòria i l'activitat de NF- κ B també es troben regulades per l'activitat de les HDACs (desacetilases d'histones) i, en concret, per la desacetilació de la subunitat p65. (Yeung i col., 2004). Estudis en cèl·lules estimulades amb TNF- α i tractades amb resveratrol, un potent agonista de les sirtuïnes, mostren una disminució de l'expressió de gens diana de NF- κ B (Yeung i col. 2004). SIRT1, una desacetilasa dependent de NAD⁺ membre de la família de les sirtuïnes, pot interaccionar físicament amb la subunitat p65 i inhibir la transcripció de NF- κ B per desacetilació de p65 a la Lys 310 (Yang i col., 2010). De fet, l'acetilació de la Lys 310 és indispensable per l'activitat de NF- κ B i la seva desacetilació a través de SIRT1 afavoreix la seva metilació i condueix a la degradació de NF- κ B (Yang i col., 2010). Com s'ha comentat anteriorment al primer estudi d'aquesta tesi doctoral, l'activació de PPAR β/δ pot augmentar l'expressió de SIRT1 (Okazaki i col., 2010). A més, l'activació de l'AMPK pot millorar l'activitat SIRT1 per increment dels nivells de NAD⁺ (Cantó i col., 2009). En aquest sentit cal comentar que, les cèl·lules tractades amb GW501516 presentaven un augment dels nivells de proteïna SIRT1, fet que també podria contribuir a reduir l'acetilació de la subunitat p65 de NF- κ B i, per tant, també podria causar una reducció de l'activitat d'aquest factor de transcripció pro-inflamatori..

En resum, els nostres resultats mostren que l'efecte antiinflamatori causat per l'activació de PPAR β/δ podria ser degut a una disminució de l'activitat de NF- κ B a través de l'activació de l'AMPK. Aquesta quinasa fosforilaria p300 i inhibiria la seva

interacció amb la subunitat p65 de NF- κ B, causant una reducció dels seus nivells d'acetilació, amb la conseqüent reducció de l'activitat transcripcional de NF- κ B. A més, l'increment dels nivells de SIRT1 causat per GW501516 també podria contribuir a reduir els nivells d'acetilació de p65 (Figura 16).

La prova definitiva de la implicació de PPAR β/δ , AMPK i SIRT1 en els efectes antiinflamatoris de GW501516 en cèl·lules HaCaT estimulades amb TNF- α , la va proporcionar la utilització d'inhibidors específics d'aquestes vies. La utilització del GSK0660 (un antagonista de PPAR β/δ), el sirtinol (inhibidor de SIRT1) i el compost C (inhibidor de l'AMPK), van demostrar que els efectes antiinflamatoris de GW501516 necessitaven del funcionament d'aquestes vies per ser-hi presents.

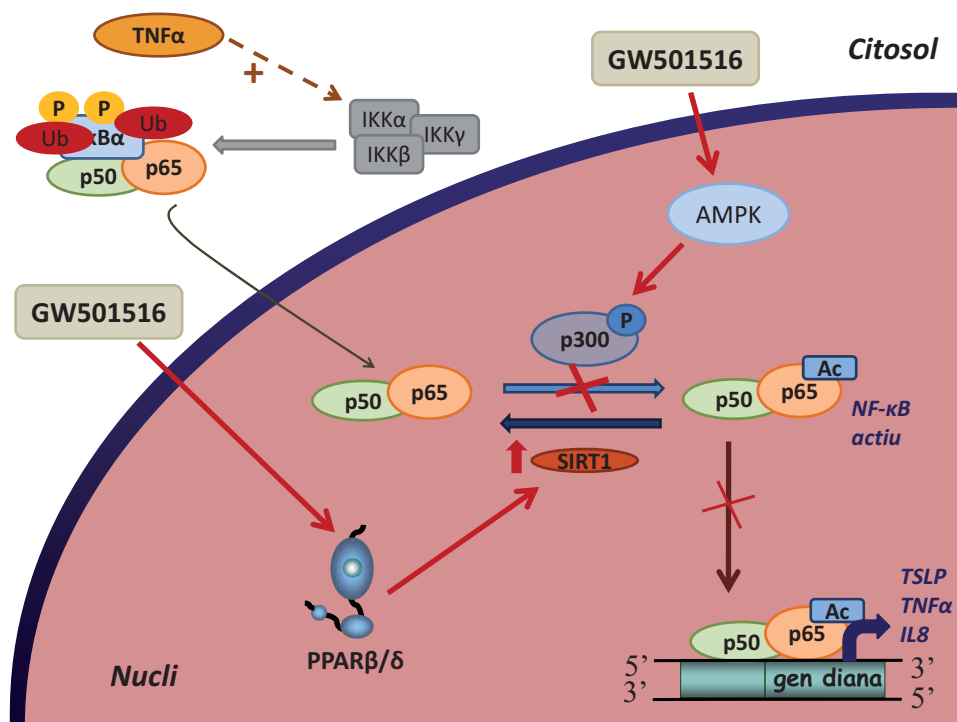


Figura 16. Esquema dels possibles mecanismes responsables de l'efecte antiinflamatori de l'agonista de PPAR β/δ GW501516 en cèl·lules HaCaT estimulades amb TNF- α . TNF- α , Factor de necrosi tumoral- α ; IKK, Quinasa de I κ B; SIRT1, *Silent information regulator T1*; NF- κ B, Factor nuclear- κ B; TSLP, *Thymic stromal lymphopoietin*; IL-8, Interleucina-8; Ub, ubiquitina; PPAR β/δ , Receptor activat per proliferadors peroxisòmic β/δ .

DISCUSSION GLOBAL

En resum, els resultats presentats en aquesta tesi doctoral aporten nous possibles mecanismes pels quals l'agonista PPAR β/δ GW501516 podria reduir els nivells de triglicèrids en plasma en un model animal de hipertrigliceridèmia evitant la reducció de l'AMPK i activant la via PGC1- α -Lipin 1-PPAR α . Tanmateix, els resultats també demostren que aquest fàrmac pot evitar la inflamació induïda per TNF- α en queratinòcits humans reduint l'activació del factor de transcripció pro-inflamatori NF- κ B per l'activació de l'AMPK i SIRT1.

CONCLUSIONS

Les principals conclusions del treball experimental d'aquesta Tesi Doctoral són les següents:

- I. L'exposició a la HFD durant tres setmanes produeix hipertrigliceridèmia acompanyada d'una reducció dels nivells hepàtics de la proteïna AMPK fosforilada implicada en la β -oxidació dels àcids grassos i en conseqüència la disminució de l'expressió de Lipina 1 i PGC1- α .
- II. L'administració de l'activador de PPAR β/δ GW501516 prevé la hipertrigliceridèmia induïda per la HFD per un mecanisme que implica l'activació hepàtica de l'AMPK, un possible augment de la captació de VLDL plasmàtics i una amplificació de la via PPAR α i l'activació dels seus gens diana a través de l'activació del sistema Lipina 1-PGC1- α -PPAR α , que finalment incrementaria la β -oxidació. Aquest fet reduiria la disponibilitat dels àcids grassos per formar triglicèrids necessaris per la formació de les VLDL.
- III. L'administració de GW501516 redueix la resposta inflamatòria estimulada per TNF- α a queratinòcits humans per reducció de l'activitat de NF- κ B i de l'expressió de citoquines pro-inflamatòries regulades per NF- κ B com TSLP, IL-8 i TNF- α .
- IV. La reducció de l'activitat de NF- κ B observada a queratinòcits implicaria una reducció de l'acetilació de la subunitat p65 a través de l'activació de l'AMPK i la inhibició de p300, a més d'un augment de la seva desacetilació per augment dels nivells de SIRT1.

BIBLIOGRAFIA

A

Abu-Elheiga, L., Brinkley, W. R., Zhong, L., Chirala, S. S., Woldegiorgis, G., & Wakil, S. J. (2000). The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(4), 1444-1449.

Abu-Elheiga, L., Matzuk, M. M., Abo-Hashema, K. A., & Wakil, S. J. (2001). Continuous fatty acid oxidation and reduced fat storage in mice lacking acetyl-CoA carboxylase 2. *Science (New York, N.Y.)*, 291(5513), 2613-2616.

Allard, M. F., Emanuel, P. G., Russell, J. A., Bishop, S. P., Digerness, S. B., & Anderson, P. G. (1994). Preischemic glycogen reduction or glycolytic inhibition improves postischemic recovery of hypertrophied rat hearts. *The American Journal of Physiology*, 267(1 Pt 2), H66-74.

Andresen, B. S., Dobrowolski, S. F., O'Reilly, L., Muenzer, J., McCandless, S. E., Frazier, D. M., et al. (2001). Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) mutations identified by MS/MS-based prospective screening of newborns differ from those observed in patients with clinical symptoms: Identification and characterization of a new, prevalent mutation that results in mild MCAD deficiency. *American Journal of Human Genetics*, 68(6), 1408-1418.

Aranda, A., & Pascual, A. (2001). Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiological Reviews*, 81(3), 1269-1304.

B

Baldwin, A. S., Jr. (1996). The NF-kappa B and I kappa B proteins: New discoveries and insights. *Annual Review of Immunology*, 14, 649-683.

Barak, Y., Liao, D., He, W., Ong, E. S., Nelson, M. C., Olefsky, J. M., et al. (2002). Effects of peroxisome proliferator-activated receptor delta on placentation, adiposity, and colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(1), 303-308.

BIBLIOGRAFIA

- Barak, Y., Nelson, M. C., Ong, E. S., Jones, Y. Z., Ruiz-Lozano, P., Chien, K. R., et al. (1999). PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Molecular Cell*, 4(4), 585-595.
- Barger, P. M., Brandt, J. M., Leone, T. C., Weinheimer, C. J., & Kelly, D. P. (2000). Deactivation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha during cardiac hypertrophic growth. *The Journal of Clinical Investigation*, 105(12), 1723-1730.
- Barger, P. M., Browning, A. C., Garner, A. N., & Kelly, D. P. (2001). P38 mitogen-activated protein kinase activates peroxisome proliferator-activated receptor alpha: A potential role in the cardiac metabolic stress response. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(48), 44495-44501.
- Barish, G. D., Narkar, V. A., & Evans, R. M. (2006). PPAR delta: A dagger in the heart of the metabolic syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(3), 590-597.
- Baumann, C. A., Chokshi, N., Saltiel, A. R., & Ribon, V. (2000). Cloning and characterization of a functional peroxisome proliferator activator receptor-gamma-responsive element in the promoter of the CAP gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(13), 9131-9135.
- Bebornitz, G. R., & Schuster, H. F. (2002). The impact of fatty acid oxidation on energy utilization: Targets and therapy. *Current Pharmaceutical Design*, 8(14), 1199-1227.
- Bell-Parikh, L. C., Ide, T., Lawson, J. A., McNamara, P., Reilly, M., & FitzGerald, G. A. (2003). Biosynthesis of 15-deoxy-delta12,14-PGJ2 and the ligation of PPARgamma. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(6), 945-955.
- Berger, J., & Moller, D. E. (2002). The mechanisms of action of PPARs. *Annual Review of Medicine*, 53, 409-435.
- Bertoni, A. G., Saydah, S., & Brancati, F. L. (2001). Diabetes and the risk of infection-related mortality in the U.S. *Diabetes Care*, 24(6), 1044-1049.
- Bishop-Bailey, D., & Bystrom, J. (2009). Emerging roles of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta in inflammation. *Pharmacology & Therapeutics*, 124(2), 141-150.

- Bishop-Bailey, D., & Wray, J. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptors: A critical review on endogenous pathways for ligand generation. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 71(1-2), 1-22.
- Blanquart, C., Barbier, O., Fruchart, J. C., Staels, B., & Glineur, C. (2002). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) turnover by the ubiquitin-proteasome system controls the ligand-induced expression level of its target genes. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(40), 37254-37259.
- Blanquart, C., Barbier, O., Fruchart, J. C., Staels, B., & Glineur, C. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptors: Regulation of transcriptional activities and roles in inflammation. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 85(2-5), 267-273.
- Blaschke, F., Takata, Y., Caglayan, E., Law, R. E., & Hsueh, W. A. (2006). Obesity, peroxisome proliferator-activated receptor, and atherosclerosis in type 2 diabetes. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 26(1), 28-40.
- Boden, G., & Laakso, M. (2004). Lipids and glucose in type 2 diabetes: What is the cause and effect? *Diabetes Care*, 27(9), 2253-2259.
- Bookout, A. L., Jeong, Y., Downes, M., Yu, R. T., Evans, R. M., & Mangelsdorf, D. J. (2006). Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network. *Cell*, 126(4), 789-799.
- Braissant, O., Fougère, F., Scotto, C., Dauca, M., & Wahli, W. (1996). Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): Tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology*, 137(1), 354-366.
- Brownsey, R. W., Zhande, R., & Boone, A. N. (1997). Isoforms of acetyl-CoA carboxylase: Structures, regulatory properties and metabolic functions. *Biochemical Society Transactions*, 25(4), 1232-1238.
- Burri, L., Thoresen, G. H., & Berge, R. K. (2010). The role of PPARalpha activation in liver and muscle. *PPAR Research*, 2010, 542359. Epub 2010 Aug 18.

BIBLIOGRAFIA

C

- Canto, C., Gerhart-Hines, Z., Feige, J. N., Lagouge, M., Noriega, L., Milne, J. C., et al. (2009). AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature*, 458(7241), 1056-1060.
- Cao, H., Gerhold, K., Mayers, J. R., Wiest, M. M., Watkins, S. M., & Hotamisligil, G. S. (2008). Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism. *Cell*, 134(6), 933-944.
- Cavender, M. A., Nicholls, S. J., & Lincoff, A. M. (2010). Strategies for the development of new PPAR agonists in diabetes. *European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation : Official Journal of the European Society of Cardiology, Working Groups on Epidemiology & Prevention and Cardiac Rehabilitation and Exercise Physiology*, 17 Suppl 1, S32-7.
- Chakravarthy, M. V., Lodhi, I. J., Yin, L., Malapaka, R. R., Xu, H. E., Turk, J., et al. (2009). Identification of a physiologically relevant endogenous ligand for PPARalpha in liver. *Cell*, 138(3), 476-488.
- Chen, L. F., & Greene, W. C. (2003). Regulation of distinct biological activities of the NF-kappaB transcription factor complex by acetylation. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 81(9), 549-557.
- Chen, L. F., & Greene, W. C. (2005). Assessing acetylation of NF-kappaB. *Methods (San Diego, Calif.)*, 36(4), 368-375.
- Chen, L. F., Williams, S. A., Mu, Y., Nakano, H., Duerr, J. M., Buckbinder, L., et al. (2005). NF-kappaB RelA phosphorylation regulates RelA acetylation. *Molecular and Cellular Biology*, 25(18), 7966-7975.
- Chen, Z., Gropler, M. C., Norris, J., Lawrence, J. C., Jr, Harris, T. E., & Finck, B. N. (2008). Alterations in hepatic metabolism in fld mice reveal a role for lipin 1 in regulating VLDL-triacylglyceride secretion. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 28(10), 1738-1744.

- Cheng, L., Ding, G., Qin, Q., Huang, Y., Lewis, W., He, N., et al. (2004). Cardiomyocyte-restricted peroxisome proliferator-activated receptor-delta deletion perturbs myocardial fatty acid oxidation and leads to cardiomyopathy. *Nature Medicine*, 10(11), 1245-1250.
- Cheng, L., Ding, G., Qin, Q., Xiao, Y., Woods, D., Chen, Y. E., et al. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor delta activates fatty acid oxidation in cultured neonatal and adult cardiomyocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313(2), 277-286.
- Chinetti, G., Griglio, S., Antonucci, M., Torra, I. P., Delerive, P., Majd, Z., et al. (1998). Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(40), 25573-25580.
- Chung, S., Yao, H., Caito, S., Hwang, J. W., Arunachalam, G., & Rahman, I. (2010). Regulation of SIRT1 in cellular functions: Role of polyphenols. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 501(1), 79-90.
- Ciaraldi, T. P., Gilmore, A., Olefsky, J. M., Goldberg, M., & Heidenreich, K. A. (1990). In vitro studies on the action of CS-045, a new antidiabetic agent. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 39(10), 1056-1062.
- Coll, T., Alvarez-Guardia, D., Barroso, E., Gomez-Foix, A. M., Palomer, X., Laguna, J. C., et al. (2010). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- δ by GW501516 prevents fatty acid-induced nuclear factor- κ B activation and insulin resistance in skeletal muscle cells. *Endocrinology*, 151(4), 1560-1569.
- Coll, T., Jove, M., Rodriguez-Calvo, R., Eyre, E., Palomer, X., Sanchez, R. M., et al. (2006). Palmitate-mediated downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha in skeletal muscle cells involves MEK1/2 and nuclear factor-kappaB activation. *Diabetes*, 55(10), 2779-2787.
- Coll, T., Rodriguez-Calvo, R., Barroso, E., Serrano, L., Eyre, E., Palomer, X., et al. (2009). Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) beta/delta: A new potential

BIBLIOGRAFIA

therapeutic target for the treatment of metabolic syndrome. *Current Molecular Pharmacology*, 2(1), 46-55.

D

Daynes, R. A., & Jones, D. C. (2002). Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. *Nature Reviews.Immunology*, 2(10), 748-759.

de Duve, C. (1969). The peroxisome: A new cytoplasmic organelle. *Proceedings of the Royal Society of London.Series B, Containing Papers of a Biological Character.Royal Society (Great Britain)*, 173(30), 71-83.

Delerive, P., De Bosscher, K., Besnard, S., Vanden Berghe, W., Peters, J. M., Gonzalez, F. J., et al. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(45), 32048-32054.

Delerive, P., Fruchart, J. C., & Staels, B. (2001). Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control. *The Journal of Endocrinology*, 169(3), 453-459.

Denke, M. A. (2006). Dietary fats, fatty acids, and their effects on lipoproteins. *Current Atherosclerosis Reports*, 8(6), 466-471.

Desvergne, B., Michalik, L., & Wahli, W. (2006). Transcriptional regulation of metabolism. *Physiological Reviews*, 86(2), 465-514.

Desvergne, B., & Wahli, W. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptors: Nuclear control of metabolism. *Endocrine Reviews*, 20(5), 649-688.

Devchand, P. R., Keller, H., Peters, J. M., Vazquez, M., Gonzalez, F. J., & Wahli, W. (1996). The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature*, 384(6604), 39-43.

Doshi, L. S., Brahma, M. K., Bahirat, U. A., Dixit, A. V., & Nemmani, K. V. (2010). Discovery and development of selective PPAR gamma modulators as safe and

effective antidiabetic agents. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 19(4), 489-512.

Dreyer, C., Krey, G., Keller, H., Givel, F., Helftenbein, G., & Wahli, W. (1992). Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell*, 68(5), 879-887.

Du, J., Guan, T., Zhang, H., Xia, Y., Liu, F., & Zhang, Y. (2008). Inhibitory crosstalk between ERK and AMPK in the growth and proliferation of cardiac fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 368(2), 402-407.

Duan, S. Z., Usher, M. G., & Mortensen, R. M. (2009). PPARs: The vasculature, inflammation and hypertension. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 18(2), 128-133.

E

Escher, P., Braissant, O., Basu-Modak, S., Michalik, L., Wahli, W., & Desvergne, B. (2001). Rat PPARs: Quantitative analysis in adult rat tissues and regulation in fasting and refeeding. *Endocrinology*, 142(10), 4195-4202.

Estall, J. L., Kahn, M., Cooper, M. P., Fisher, F. M., Wu, M. K., Laznik, D., et al. (2009). Sensitivity of lipid metabolism and insulin signaling to genetic alterations in hepatic peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha expression. *Diabetes*, 58(7), 1499-1508.

F

Fajas, L., Fruchart, J. C., & Auwerx, J. (1998). PPARgamma3 mRNA: A distinct PPARgamma mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Letters*, 438(1-2), 55-60.

Fan, Y., Wang, Y., Tang, Z., Zhang, H., Qin, X., Zhu, Y., et al. (2008). Suppression of pro-inflammatory adhesion molecules by PPAR-delta in human vascular endothelial cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 28(2), 315-321.

BIBLIOGRAFIA

Finck, B. N., Gropler, M. C., Chen, Z., Leone, T. C., Croce, M. A., Harris, T. E., et al. (2006). Lipin 1 is an inducible amplifier of the hepatic PGC-1alpha/PPARalpha regulatory pathway. *Cell Metabolism*, 4(3), 199-210.

Finck, B. N., Gropler, M. C., Chen, Z., Leone, T. C., Croce, M. A., Harris, T. E., et al. (2006). Lipin 1 is an inducible amplifier of the hepatic PGC-1alpha/PPARalpha regulatory pathway. *Cell Metabolism*, 4(3), 199-210.

G

Gerritsen, M. E., Williams, A. J., Neish, A. S., Moore, S., Shi, Y., & Collins, T. (1997). CREB-binding protein/p300 are transcriptional coactivators of p65. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(7), 2927-2932.

Ghosh, H. S., Spencer, J. V., Ng, B., McBurney, M. W., & Robbins, P. D. (2007). Sirt1 interacts with transducin-like enhancer of split-1 to inhibit nuclear factor kappaB-mediated transcription. *The Biochemical Journal*, 408(1), 105-111.

Ghosh, S., & Karin, M. (2002). Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell*, 109 Suppl, S81-96.

Gilde, A. J., van der Lee, K. A., Willemsen, P. H., Chinetti, G., van der Leij, F. R., van der Vusse, G. J., et al. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and PPARbeta/delta, but not PPARgamma, modulate the expression of genes involved in cardiac lipid metabolism. *Circulation Research*, 92(5), 518-524.

Ginsberg, H. N., & Maccallum, P. R. (2009). The obesity, metabolic syndrome, and type 2 diabetes mellitus pandemic: II. therapeutic management of atherogenic dyslipidemia. *Journal of Clinical Hypertension (Greenwich, Conn.)*, 11(9), 520-527.

Ginsberg, H. N., Zhang, Y. L., & Hernandez-Ono, A. (2006). Metabolic syndrome: Focus on dyslipidemia. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 14 Suppl 1, 41S-49S.

- González, F. J. (2007). Animal models for human risk assessment: The peroxisome proliferator-activated receptor alpha-humanized mouse. *Nutrition Reviews*, 65(6 Pt 2), S2-6.
- González, M.C., Panadero, M.I., Herrera, E., Bocos, C. (2007). PPA α as target for pharmacological and nutritional agents affecting lipid metabolism. *New Emerging Pharmacological Targets in Metabolic Diseases*, 71-118
- Gottschling-Zeller, H., Rohrig, K., & Hauner, H. (2000). Troglitazone reduces plasminogen activator inhibitor-1 expression and secretion in cultured human adipocytes. *Diabetologia*, 43(3), 377-383.
- Grimaldi, P. A. (2010). Metabolic and nonmetabolic regulatory functions of peroxisome proliferator-activated receptor beta. *Current Opinion in Lipidology*, 21(3), 186-191.
- Grundey, S. M. (1998). Hypertriglyceridemia, atherogenic dyslipidemia, and the metabolic syndrome. *The American Journal of Cardiology*, 81(4A), 18B-25B.
- Guerre-Millo, M., Gervois, P., Raspe, E., Madsen, L., Poulain, P., Derudas, B., et al. (2000). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activators improve insulin sensitivity and reduce adiposity. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(22), 16638-16642.
- Gulick, T., Cresci, S., Caira, T., Moore, D. D., & Kelly, D. P. (1994). The peroxisome proliferator-activated receptor regulates mitochondrial fatty acid oxidative enzyme gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(23), 11012-11016.
- Gulick, T., Cresci, S., Caira, T., Moore, D. D., & Kelly, D. P. (1994). The peroxisome proliferator-activated receptor regulates mitochondrial fatty acid oxidative enzyme gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(23), 11012-11016.

BIBLIOGRAFIA

H

- Hacker, H., & Karin, M. (2006). Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Science's STKE : Signal Transduction Knowledge Environment*, 2006(357), re13.
- Halpern, A., Mancini, M. C., Magalhaes, M. E., Fisberg, M., Radominski, R., Bertolami, M. C., et al. (2010). Metabolic syndrome, dyslipidemia, hypertension and type 2 diabetes in youth: From diagnosis to treatment. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 2, 55.
- Hardie, D. G. (2004). The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. *Journal of Cell Science*, 117(Pt 23), 5479-5487.
- Hatano, Y., Man, M. Q., Uchida, Y., Crumrine, D., Mauro, T. M., Feingold, K. R., et al. (2010). Murine atopic dermatitis responds to peroxisome proliferator-activated receptors alpha and beta/delta (but not gamma) and liver X receptor activators. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(1), 160-9.e1-5.
- Hauser, S., Adelmant, G., Sarraf, P., Wright, H. M., Mueller, E., & Spiegelman, B. M. (2000). Degradation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma is linked to ligand-dependent activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(24), 18527-18533.
- Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2004). Signaling to NF-kappaB. *Genes & Development*, 18(18), 2195-2224.
- He, W., Barak, Y., Hevener, A., Olson, P., Liao, D., Le, J., et al. (2003). Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor gamma knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(26), 15712-15717.
- Heery, D. M., Kalkhoven, E., Hoare, S., & Parker, M. G. (1997). A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature*, 387(6634), 733-736.

- Higashida, K., Higuchi, M., & Terada, S. (2008). Potential role of lipin-1 in exercise-induced mitochondrial biogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 374(3), 587-591.
- Hirai, S., Takahashi, N., Goto, T., Lin, S., Uemura, T., Yu, R., et al. (2010). Functional food targeting the regulation of obesity-induced inflammatory responses and pathologies. *Mediators of Inflammation*, 2010, 367838.
- Hofmann, C., Lorenz, K., Braithwaite, S. S., Colca, J. R., Palazuk, B. J., Hotamisligil, G. S., et al. (1994). Altered gene expression for tumor necrosis factor-alpha and its receptors during drug and dietary modulation of insulin resistance. *Endocrinology*, 134(1), 264-270.
- Holm, C. (2003). Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochemical Society Transactions*, 31(Pt 6), 1120-1124.
- Hondares, E., Pineda-Torra, I., Iglesias, R., Staels, B., Villarroya, F., & Giralt, M. (2007). PPARdelta, but not PPARalpha, activates PGC-1alpha gene transcription in muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 354(4), 1021-1027.
- Hong, C., & Tontonoz, P. (2008). Coordination of inflammation and metabolism by PPAR and LXR nuclear receptors. *Current Opinion in Genetics & Development*, 18(5), 461-467.
- Hotamisligil, G. S., Murray, D. L., Choy, L. N., & Spiegelman, B. M. (1994). Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(11), 4854-4858.
- Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S., & Spiegelman, B. M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: Direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science (New York, N.Y.)*, 259(5091), 87-91.

BIBLIOGRAFIA

- Hou, X., Xu, S., Maitland-Toolan, K. A., Sato, K., Jiang, B., Ido, Y., et al. (2008). SIRT1 regulates hepatocyte lipid metabolism through activating AMP-activated protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(29), 20015-20026.
- Hsueh, W. A., & Law, R. (2003). The central role of fat and effect of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma on progression of insulin resistance and cardiovascular disease. *The American Journal of Cardiology*, 92(4A), 3J-9J.
- Hu, E., Kim, J. B., Sarraf, P., & Spiegelman, B. M. (1996). Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPARgamma. *Science (New York, N.Y.)*, 274(5295), 2100-2103.
- Huang, W., & Glass, C. K. (2010). Nuclear receptors and inflammation control: Molecular mechanisms and pathophysiological relevance. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(8), 1542-1549.
- Hunt, M. C., & Alexson, S. E. (2002). The role acyl-CoA thioesterases play in mediating intracellular lipid metabolism. *Progress in Lipid Research*, 41(2), 99-130.
- Huss, J. M., & Kelly, D. P. (2004). Nuclear receptor signaling and cardiac energetics. *Circulation Research*, 95(6), 568-578.
- I
- Im, S. S., Kim, M. Y., Kwon, S. K., Kim, T. H., Bae, J. S., Kim, H., et al. (2010). PPAR{alpha} upregulates hepatic glucose-6-phosphatase expression in fasting and DB/DB diabetic mice. *The Journal of Biological Chemistry*,
- Imai, S., & Kiess, W. (2009). Therapeutic potential of SIRT1 and NAMPT-mediated NAD biosynthesis in type 2 diabetes. *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library*, 14, 2983-2995.
- Inoue, I., Shino, K., Noji, S., Awata, T., & Katayama, S. (1998). Expression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR alpha) in primary cultures of human vascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 246(2), 370-374.

Isomaa, B., Almgren, P., Tuomi, T., Forsen, B., Lahti, K., Nissen, M., et al. (2001). Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care*, 24(4), 683-689.

Issemann, I., & Green, S. (1990). Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*, 347(6294), 645-650.

Izai, K., Uchida, Y., Orii, T., Yamamoto, S., & Hashimoto, T. (1992). Novel fatty acid beta-oxidation enzymes in rat liver mitochondria. I. purification and properties of very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(2), 1027-1033.

J

Jackson, L., Wahli, W., Michalik, L., Watson, S. A., Morris, T., Anderton, K., et al. (2003). Potential role for peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) in preventing colon cancer. *Gut*, 52(9), 1317-1322.

Jiang, C., Ting, A. T., & Seed, B. (1998). PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature*, 391(6662), 82-86.

Johansen, C., Flindt, E., Kragballe, K., Henningsen, J., Westergaard, M., Kristiansen, K., et al. (2005). Inverse regulation of the nuclear factor-kappaB binding to the p53 and interleukin-8 kappaB response elements in lesional psoriatic skin. *The Journal of Investigative Dermatology*, 124(6), 1284-1292.

Johnson, B. A., Wilson, E. M., Li, Y., Moller, D. E., Smith, R. G., & Zhou, G. (2000). Ligand-induced stabilization of PPARgamma monitored by NMR spectroscopy: Implications for nuclear receptor activation. *Journal of Molecular Biology*, 298(2), 187-194.

Juge-Aubry, C. E., Hammar, E., Siegrist-Kaiser, C., Pernin, A., Takeshita, A., Chin, W. W., et al. (1999). Regulation of the transcriptional activity of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha by phosphorylation of a ligand-independent trans-activating domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(15), 10505-10510.

BIBLIOGRAFIA

K

- Kagaya, Y., Kanno, Y., Takeyama, D., Ishide, N., Maruyama, Y., Takahashi, T., et al. (1990). Effects of long-term pressure overload on regional myocardial glucose and free fatty acid uptake in rats. A quantitative autoradiographic study. *Circulation*, *81*(4), 1353-1361.
- Kallen, C. B., & Lazar, M. A. (1996). Antidiabetic thiazolidinediones inhibit leptin (ob) gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(12), 5793-5796.
- Karagianni, P., & Wong, J. (2007). HDAC3: Taking the SMRT-N-CoRrect road to repression. *Oncogene*, *26*(37), 5439-5449.
- Karin, M., & Ben-Neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: The control of NF- κ B activity. *Annual Review of Immunology*, *18*, 621-663.
- Kaufman, C. K., & Fuchs, E. (2000). It's got you covered. NF-kappaB in the epidermis. *The Journal of Cell Biology*, *149*(5), 999-1004.
- Kausch, C., Krutzfeldt, J., Witke, A., Rettig, A., Bachmann, O., Rett, K., et al. (2001). Effects of troglitazone on cellular differentiation, insulin signaling, and glucose metabolism in cultured human skeletal muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *280*(3), 664-674.
- Kelly, L. J., Vicario, P. P., Thompson, G. M., Candelore, M. R., Doebber, T. W., Ventre, J., et al. (1998). Peroxisome proliferator-activated receptors gamma and alpha mediate in vivo regulation of uncoupling protein (UCP-1, UCP-2, UCP-3) gene expression. *Endocrinology*, *139*(12), 4920-4927.
- Kendrick, A. A., Choudhury, M., Rahman, S. M., McCurdy, C. E., Friederich, M., Vanhove, J. L., et al. (2010). Fatty liver is associated with reduced SIRT3 activity and mitochondrial protein hyperacetylation. *The Biochemical Journal*,

- Kersten, S., Seydoux, J., Peters, J. M., Gonzalez, F. J., Desvergne, B., & Wahli, W. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *The Journal of Clinical Investigation*, 103(11), 1489-1498.
- Keys, A. (1965). Effects of different dietary fats on plasma-lipid levels. *Lancet*, 1(7380), 318-319.
- Kiernan, R., Bres, V., Ng, R. W., Coudart, M. P., El Messaoudi, S., Sardet, C., et al. (2003). Post-activation turn-off of NF-kappa B-dependent transcription is regulated by acetylation of p65. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(4), 2758-2766.
- Kim, H. J., Ham, S. A., Kim, S. U., Hwang, J. Y., Kim, J. H., Chang, K. C., et al. (2008). Transforming growth factor-beta1 is a molecular target for the peroxisome proliferator-activated receptor delta. *Circulation Research*, 102(2), 193-200.
- Kliwer, S. A., Forman, B. M., Blumberg, B., Ong, E. S., Borgmeyer, U., Mangelsdorf, D. J., et al. (1994). Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(15), 7355-7359.
- Knutti, D., & Kralli, A. (2001). PGC-1, a versatile coactivator. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 12(8), 360-365.
- Koutnikova, H., Cock, T. A., Watanabe, M., Houten, S. M., Champy, M. F., Dierich, A., et al. (2003). Compensation by the muscle limits the metabolic consequences of lipodystrophy in PPAR gamma hypomorphic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(24), 14457-14462.
- Kramer, D. K., Al-Khalili, L., Guigas, B., Leng, Y., Garcia-Roves, P. M., & Krook, A. (2007). Role of AMP kinase and PPARdelta in the regulation of lipid and glucose metabolism in human skeletal muscle. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(27), 19313-19320.
- Kramer, D. K., Al-Khalili, L., Perrini, S., Skogsberg, J., Wretenberg, P., Kannisto, K., et al. (2005). Direct activation of glucose transport in primary human myotubes after

BIBLIOGRAFIA

activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta. *Diabetes*, 54(4), 1157-1163.

Krauss, R. M. (2004). Lipids and lipoproteins in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 27(6), 1496-1504.

L

Laffel, L. (1999). Ketone bodies: A review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes. *Diabetes/metabolism Research and Reviews*, 15(6), 412-426.

Lan, F., Cacicedo, J. M., Ruderman, N., & Ido, Y. (2008). SIRT1 modulation of the acetylation status, cytosolic localization, and activity of LKB1. possible role in AMP-activated protein kinase activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(41), 27628-27635.

Lanneau, D., Wettstein, G., Bonniaud, P., & Garrido, C. (2010). Heat shock proteins: Cell protection through protein triage. *TheScientificWorldJournal*, 10, 1543-1552.

Larter, C. Z., Yeh, M. M., Haigh, W. G., Williams, J., Brown, S., Bell-Anderson, K. S., et al. (2008). Hepatic free fatty acids accumulate in experimental steatohepatitis: Role of adaptive pathways. *Journal of Hepatology*, 48(4), 638-647.

Lee, C. H., Chawla, A., Urbiztondo, N., Liao, D., Boisvert, W. A., Evans, R. M., et al. (2003). Transcriptional repression of atherogenic inflammation: Modulation by PPARdelta. *Science (New York, N.Y.)*, 302(5644), 453-457.

Lee, C. H., Olson, P., Hevener, A., Mehl, I., Chong, L. W., Olefsky, J. M., et al. (2006). PPARdelta regulates glucose metabolism and insulin sensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(9), 3444-3449.

Lee, J. H., Song, M. Y., Song, E. K., Kim, E. K., Moon, W. S., Han, M. K., et al. (2009). Overexpression of SIRT1 protects pancreatic beta-cells against cytokine toxicity by suppressing the nuclear factor-kappaB signaling pathway. *Diabetes*, 58(2), 344-351.

- Lee, W. J., Kim, M., Park, H. S., Kim, H. S., Jeon, M. J., Oh, K. S., et al. (2006). AMPK activation increases fatty acid oxidation in skeletal muscle by activating PPARalpha and PGC-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 340(1), 291-295.
- Lehmann, J. M., Lenhard, J. M., Oliver, B. B., Ringold, G. M., & Kliewer, S. A. (1997). Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(6), 3406-3410.
- Lewis, G. F. (1997). Fatty acid regulation of very low density lipoprotein production. *Curr. Opin. Lipidol.* 8:146-153
- Lewis, G. F., & Rader, D. J. (2005). New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circulation Research*, 96(12), 1221-1232.
- Li, M., Pascual, G., & Glass, C. K. (2000). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene. *Molecular and Cellular Biology*, 20(13), 4699-4707.
- Liou, J. Y., Lee, S., Ghelani, D., Matijevic-Aleksic, N., & Wu, K. K. (2006). Protection of endothelial survival by peroxisome proliferator-activated receptor-delta mediated 14-3-3 upregulation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 26(7), 1481-1487.
- Liu, Y. Y., & Brent, G. A. (2010). Thyroid hormone crosstalk with nuclear receptor signaling in metabolic regulation. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 21(3), 166-173.
- Luquet, S., Lopez-Soriano, J., Holst, D., Fredenrich, A., Melki, J., Rassoulzadegan, M., et al. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor delta controls muscle development and oxidative capability. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(15), 2299-2301.
- Luquet, S., Lopez-Soriano, J., Holst, D., Gaudel, C., Jehl-Pietri, C., Fredenrich, A., et al. (2004). Roles of peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARdelta) in

BIBLIOGRAFIA

the control of fatty acid catabolism. A new target for the treatment of metabolic syndrome. *Biochimie*, 86(11), 833-837.

M

Maeda, N., Takahashi, M., Funahashi, T., Kihara, S., Nishizawa, H., Kishida, K., et al. (2001). PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes*, 50(9), 2094-2099.

Majdalawieh, A., & Ro, H. S. (2010). Regulation of IkappaBalpha function and NF-kappaB signaling: AEBP1 is a novel proinflammatory mediator in macrophages. *Mediators of Inflammation*, 2010, 823821.

Martin, G., Schoonjans, K., Lefebvre, A. M., Staels, B., & Auwerx, J. (1997). Coordinate regulation of the expression of the fatty acid transport protein and acyl-CoA synthetase genes by PPARalpha and PPARgamma activators. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(45), 28210-28217.

Martin, H. (2009). Role of PPAR-gamma in inflammation. prospects for therapeutic intervention by food components. *Mutation Research*, 669(1-2), 1-7.

Marx, N., Mach, F., Sauty, A., Leung, J. H., Sarafi, M. N., Ransohoff, R. M., et al. (2000). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators inhibit IFN-gamma-induced expression of the T cell-active CXC chemokines IP-10, mig, and I-TAC in human endothelial cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 164(12), 6503-6508.

Michalik, L., Auwerx, J., Berger, J. P., Chatterjee, V. K., Glass, C. K., Gonzalez, F. J., et al. (2006). International union of pharmacology. LXI. peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacological Reviews*, 58(4), 726-741.

Michalik, L., Desvergne, B., & Wahli, W. (2004). Peroxisome-proliferator-activated receptors and cancers: Complex stories. *Nature Reviews.Cancer*, 4(1), 61-70.

Michalik, L., & Wahli, W. (2007). Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in skin health, repair and disease. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1771(8), 991-998.

- Miles, P. D., Romeo, O. M., Higo, K., Cohen, A., Rafaat, K., & Olefsky, J. M. (1997). TNF-alpha-induced insulin resistance in vivo and its prevention by troglitazone. *Diabetes*, *46*(11), 1678-1683.
- Misra, A., Singhal, N., & Khurana, L. (2010). Obesity, the metabolic syndrome, and type 2 diabetes in developing countries: Role of dietary fats and oils. *Journal of the American College of Nutrition*, *29*(3 Suppl), 289S-301S.
- Mitchell, G. A., Kassovska-Bratinova, S., Boukaftane, Y., Robert, M. F., Wang, S. P., Ashmarina, L., et al. (1995). Medical aspects of ketone body metabolism. *Clinical and Investigative Medicine. Medecine Clinique Et Experimentale*, *18*(3), 193-216.
- Moller, D. E., & Berger, J. P. (2003). Role of PPARs in the regulation of obesity-related insulin sensitivity and inflammation. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders : Journal of the International Association for the Study of Obesity*, *27* Suppl 3, S17-21.
- Moller, D. E., & Greene, D. A. (2001). Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma agonists for diabetes. *Advances in Protein Chemistry*, *56*, 181-212.
- Moraes, L. A., Piqueras, L., & Bishop-Bailey, D. (2006). Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. *Pharmacology & Therapeutics*, *110*(3), 371-385.
- Moras, D., & Gronemeyer, H. (1998). The nuclear receptor ligand-binding domain: Structure and function. *Current Opinion in Cell Biology*, *10*(3), 384-391.
- Mukherjee, R., Jow, L., Noonan, D., & McDonnell, D. P. (1994). Human and rat peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) demonstrate similar tissue distribution but different responsiveness to PPAR activators. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *51*(3-4), 157-166.
- Munday, M. R., & Hemingway, C. J. (1999). The regulation of acetyl-CoA carboxylase--a potential target for the action of hypolipidemic agents. *Advances in Enzyme Regulation*, *39*, 205-234.

BIBLIOGRAFIA

Muoio, D. M., MacLean, P. S., Lang, D. B., Li, S., Houmard, J. A., Way, J. M., et al. (2002). Fatty acid homeostasis and induction of lipid regulatory genes in skeletal muscles of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha knock-out mice. evidence for compensatory regulation by PPAR delta. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(29), 26089-26097.

N

Nagy, L., Kao, H. Y., Chakravarti, D., Lin, R. J., Hassig, C. A., Ayer, D. E., et al. (1997). Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell*, 89(3), 373-380.

Nagy, L., Tontonoz, P., Alvarez, J. G., Chen, H., & Evans, R. M. (1998). Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell*, 93(2), 229-240.

O

Oberfield, J. L., Collins, J. L., Holmes, C. P., Goreham, D. M., Cooper, J. P., Cobb, J. E., et al. (1999). A peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand inhibits adipocyte differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(11), 6102-6106.

Okazaki, M., Iwasaki, Y., Nishiyama, M., Taguchi, T., Tsugita, M., Nakayama, S., et al. (2010). PPARbeta/delta regulates the human SIRT1 gene transcription via Sp1. *Endocrine Journal*, 57(5), 403-413.

Okuno, A., Tamemoto, H., Tobe, K., Ueki, K., Mori, Y., Iwamoto, K., et al. (1998). Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *The Journal of Clinical Investigation*, 101(6), 1354-1361.

Olefsky, J. M., & Glass, C. K. (2010). Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annual Review of Physiology*, 72, 219-246.

Oliver, W. R., Jr, Shenk, J. L., Snaith, M. R., Russell, C. S., Plunket, K. D., Bodkin, N. L., et al. (2001). A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(9), 5306-5311.

Osler, M. E., & Zierath, J. R. (2008). Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase regulation of fatty acid oxidation in skeletal muscle. *Endocrinology*, 149(3), 935-941.

Owen, O. E., Morgan, A. P., Kemp, H. G., Sullivan, J. M., Herrera, M. G., & Cahill, G. F., Jr. (1967). Brain metabolism during fasting. *The Journal of Clinical Investigation*, 46(10), 1589-1595.

P

Pahl, H. L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*, 18(49), 6853-6866.

Palmer, C. N., Hsu, M. H., Griffin, K. J., Raucy, J. L., & Johnson, E. F. (1998). Peroxisome proliferator activated receptor-alpha expression in human liver. *Molecular Pharmacology*, 53(1), 14-22.

Panadero I., González M C., Herrera M., Bocos C. (2008). Modulación del PPAR α por agentes farmacológicos y naturales y sus implicaciones metabólicas. *Clínica e investigación en Arteriosclerosis*, 20 (6), 259-289.

Peraldi, P., Xu, M., & Spiegelman, B. M. (1997). Thiazolidinediones block tumor necrosis factor-alpha-induced inhibition of insulin signaling. *The Journal of Clinical Investigation*, 100(7), 1863-1869.

Perkins, N. D., Felzien, L. K., Betts, J. C., Leung, K., Beach, D. H., & Nabel, G. J. (1997). Regulation of NF-kappaB by cyclin-dependent kinases associated with the p300 coactivator. *Science (New York, N.Y.)*, 275(5299), 523-527.

BIBLIOGRAFIA

- Peterfy, M., Phan, J., Xu, P., & Reue, K. (2001). Lipodystrophy in the fld mouse results from mutation of a new gene encoding a nuclear protein, lipin. *Nature Genetics*, 27(1), 121-124.
- Peters, J. M., Lee, S. S., Li, W., Ward, J. M., Gavrilova, O., Everett, C., et al. (2000). Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor beta(delta). *Molecular and Cellular Biology*, 20(14), 5119-5128.
- Pette, D., & Staron, R. S. (2000). Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microscopy Research and Technique*, 50(6), 500-509.
- Picard, F., & Auwerx, J. (2002). PPAR(gamma) and glucose homeostasis. *Annual Review of Nutrition*, 22, 167-197.
- Pineda Torra, I., Gervois, P., & Staels, B. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha in metabolic disease, inflammation, atherosclerosis and aging. *Current Opinion in Lipidology*, 10(2), 151-159.
- Piqueras, L., Sanz, M. J., Perretti, M., Morcillo, E., Norling, L., Mitchell, J. A., et al. (2009). Activation of PPARbeta/delta inhibits leukocyte recruitment, cell adhesion molecule expression, and chemokine release. *Journal of Leukocyte Biology*, 86(1), 115-122.
- Planavila, A., Alegret, M., Sanchez, R. M., Rodriguez-Calvo, R., Laguna, J. C., & Vazquez-Carrera, M. (2005). Increased akt protein expression is associated with decreased ceramide content in skeletal muscle of troglitazone-treated mice. *Biochemical Pharmacology*, 69(8), 1195-1204.
- Pozzi, A., Ibanez, M. R., Gatica, A. E., Yang, S., Wei, S., Mei, S., et al. (2007). Peroxisomal proliferator-activated receptor-alpha-dependent inhibition of endothelial cell proliferation and tumorigenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(24), 17685-17695.

Puigserver, P., & Spiegelman, B. M. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): Transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocrine Reviews*, 24(1), 78-90.

Puigserver, P., Wu, Z., Park, C. W., Graves, R., Wright, M., & Spiegelman, B. M. (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*, 92(6), 829-839.

Pyper, S. R., Viswakarma, N., Yu, S., & Reddy, J. K. (2010). PPARalpha: Energy combustion, hypolipidemia, inflammation and cancer. *Nuclear Receptor Signaling*, 8, e002.

Q

Qatanani, M., & Lazar, M. A. (2007). Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: Many choices on the menu. *Genes & Development*, 21(12), 1443-1455.

R

Rangwala, S. M., & Lazar, M. A. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in diabetes and metabolism. *Trends in Pharmacological Sciences*, 25(6), 331-336.

Reddy, J. K. (2001). Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. III. peroxisomal beta-oxidation, PPAR alpha, and steatohepatitis. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 281(6), G1333-9.

Reue, K. (2009). The lipin family: Mutations and metabolism. *Current Opinion in Lipidology*, 20(3), 165-170.

Riserus, U., Sprecher, D., Johnson, T., Olson, E., Hirschberg, S., Liu, A., et al. (2008). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)delta promotes reversal of multiple metabolic abnormalities, reduces oxidative stress, and increases fatty acid oxidation in moderately obese men. *Diabetes*, 57(2), 332-339.

BIBLIOGRAFIA

- Rival, Y., Beneteau, N., Taillandier, T., Pezet, M., Dupont-Passelaigue, E., Patoiseau, J. F., et al. (2002). PPARalpha and PPARdelta activators inhibit cytokine-induced nuclear translocation of NF-kappaB and expression of VCAM-1 in EAhy926 endothelial cells. *European Journal of Pharmacology*, 435(2-3), 143-151.
- Rizzo, G., & Fiorucci, S. (2006). PPARs and other nuclear receptors in inflammation. *Current Opinion in Pharmacology*, 6(4), 421-427.
- Rodriguez-Calvo, R., Serrano, L., Coll, T., Moullan, N., Sanchez, R. M., Merlos, M., et al. (2008). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta inhibits lipopolysaccharide-induced cytokine production in adipocytes by lowering nuclear factor-kappaB activity via extracellular signal-related kinase 1/2. *Diabetes*, 57(8), 2149-2157.
- Roglans, N., Sanguino, E., Peris, C., Alegret, M., Vazquez, M., Adzet, T., et al. (2002). Atorvastatin treatment induced peroxisome proliferator-activated receptor alpha expression and decreased plasma nonesterified fatty acids and liver triglyceride in fructose-fed rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 302(1), 232-239.
- Rosen, E. D., & Spiegelman, B. M. (2001). PPARgamma : A nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(41), 37731-37734.
- Rosen, E. D., Walkey, C. J., Puigserver, P., & Spiegelman, B. M. (2000). Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes & Development*, 14(11), 1293-1307.
- Rothwarf, D. M., & Karin, M. (1999). The NF-kappa B activation pathway: A paradigm in information transfer from membrane to nucleus. *Science's STKE : Signal Transduction Knowledge Environment*, 1999(5), RE1.
- Ruderman, N. B., Saha, A. K., Vavvas, D., & Witters, L. A. (1999). Malonyl-CoA, fuel sensing, and insulin resistance. *The American Journal of Physiology*, 276(1 Pt 1), E1-E18.

Ruderman, N. B., Xu, X. J., Nelson, L., Cacicedo, J. M., Saha, A. K., Lan, F., et al. (2010). AMPK and SIRT1: A long-standing partnership? *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 298(4), E751-60.

S

Saha, A. K., Schwarsin, A. J., Roudit, R., Masse, F., Kaushik, V., Tornheim, K., et al. (2000). Activation of malonyl-CoA decarboxylase in rat skeletal muscle by contraction and the AMP-activated protein kinase activator 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(32), 24279-24283.

Salminen, A., Kauppinen, A., Suuronen, T., & Kaarniranta, K. (2008). SIRT1 longevity factor suppresses NF-kappaB -driven immune responses: Regulation of aging via NF-kappaB acetylation? *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 30(10), 939-942.

Sanderson, L. M., Boekschoten, M. V., Desvergne, B., Muller, M., & Kersten, S. (2010). Transcriptional profiling reveals divergent roles of PPARalpha and PPARbeta/delta in regulation of gene expression in mouse liver. *Physiological Genomics*, 41(1), 42-52.

Sasaki, M., Jordan, P., Welbourne, T., Minagar, A., Joh, T., Itoh, M., et al. (2005). Troglitazone, a PPAR-gamma activator prevents endothelial cell adhesion molecule expression and lymphocyte adhesion mediated by TNF-alpha. *BMC Physiology*, 5(1), 3.

Schmidt, A., Endo, N., Rutledge, S. J., Vogel, R., Shinar, D., & Rodan, G. A. (1992). Identification of a new member of the steroid hormone receptor superfamily that is activated by a peroxisome proliferator and fatty acids. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 6(10), 1634-1641.

Schulz, H. (1991). Beta oxidation of fatty acids. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1081(2), 109-120.

BIBLIOGRAFIA

- Sfeir, Z., Ibrahimi, A., Amri, E., Grimaldi, P., & Abumrad, N. (1997). Regulation of FAT/CD36 gene expression: Further evidence in support of a role of the protein in fatty acid binding/transport. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, 57(1), 17-21.
- Shalev, A., Siegrist-Kaiser, C. A., Yen, P. M., Wahli, W., Burger, A. G., Chin, W. W., et al. (1996). The peroxisome proliferator-activated receptor alpha is a phosphoprotein: Regulation by insulin. *Endocrinology*, 137(10), 4499-4502.
- Shaw, R. J., Lamia, K. A., Vasquez, D., Koo, S. H., Bardeesy, N., Depinho, R. A., et al. (2005). The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science (New York, N.Y.)*, 310(5754), 1642-1646.
- Sheppard, K. A., Rose, D. W., Haque, Z. K., Kurokawa, R., McInerney, E., Westin, S., et al. (1999). Transcriptional activation by NF-kappaB requires multiple coactivators. *Molecular and Cellular Biology*, 19(9), 6367-6378.
- Sigrist, S., Bedoucha, M., & Boelsterli, U. A. (2000). Down-regulation by troglitazone of hepatic tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 mRNA expression in a murine model of non-insulin-dependent diabetes. *Biochemical Pharmacology*, 60(1), 67-75.
- Smeets, P. J., Teunissen, B. E., Planavila, A., de Vogel-van den Bosch, H., Willemsen, P. H., van der Vusse, G. J., et al. (2008). Inflammatory pathways are activated during cardiomyocyte hypertrophy and attenuated by peroxisome proliferator-activated receptors PPARalpha and PPARdelta. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(43), 29109-29118.
- Smith, U. (2002). Impaired ('diabetic') insulin signaling and action occur in fat cells long before glucose intolerance--is insulin resistance initiated in the adipose tissue? *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders : Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 26(7), 897-904.
- Staels, B., Koenig, W., Habib, A., Merval, R., Lebret, M., Torra, I. P., et al. (1998). Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators. *Nature*, 393(6687), 790-793.

- Steppan, C. M., Bailey, S. T., Bhat, S., Brown, E. J., Banerjee, R. R., Wright, C. M., et al. (2001). The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*, *409*(6818), 307-312.
- Straus, D. S., & Glass, C. K. (2007). Anti-inflammatory actions of PPAR ligands: New insights on cellular and molecular mechanisms. *Trends in Immunology*, *28*(12), 551-558.
- Sugawara, A., Uruno, A., Kudo, M., Matsuda, K., Yang, C. W., & Ito, S. (2010). Effects of PPARgamma on hypertension, atherosclerosis, and chronic kidney disease. *Endocrine Journal*, *57*(10), 847-852.
- Sugden, M. C., Caton, P. W., & Holness, M. J. (2010). PPAR control: It's SIRTainly as easy as PGC. *The Journal of Endocrinology*, *204*(2), 93-104.
- Sur, R., Lyte, P. A., & Southall, M. D. (2008). Hsp27 regulates pro-inflammatory mediator release in keratinocytes by modulating NF-kappaB signaling. *The Journal of Investigative Dermatology*, *128*(5), 1116-1122.
- Szanto, A., & Nagy, L. (2008). The many faces of PPARgamma: Anti-inflammatory by any means? *Immunobiology*, *213*(9-10), 789-803.

T

- Takada, I., Yu, R. T., Xu, H. E., Lambert, M. H., Montana, V. G., Kliewer, S. A., et al. (2000). Alteration of a single amino acid in peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR alpha) generates a PPAR delta phenotype. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, *14*(5), 733-740.
- Takahashi, S., Tanaka, T., Kodama, T., & Sakai, J. (2006). Peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARdelta), a novel target site for drug discovery in metabolic syndrome. *Pharmacological Research : The Official Journal of the Italian Pharmacological Society*, *53*(6), 501-507.
- Takata, Y., Kitami, Y., Yang, Z. H., Nakamura, M., Okura, T., & Hiwada, K. (2002). Vascular inflammation is negatively autoregulated by interaction between

BIBLIOGRAFIA

- CCAAT/enhancer-binding protein-delta and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Circulation Research*, 91(5), 427-433.
- Tan, N. S., Michalik, L., Noy, N., Yasmin, R., Pacot, C., Heim, M., et al. (2001). Critical roles of PPAR beta/delta in keratinocyte response to inflammation. *Genes & Development*, 15(24), 3263-3277.
- Tanaka, T., Yamamoto, J., Iwasaki, S., Asaba, H., Hamura, H., Ikeda, Y., et al. (2003). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(26), 15924-15929.
- Thavendiranathan, P., Bagai, A., Brookhart, M. A., & Choudhry, N. K. (2006). Primary prevention of cardiovascular diseases with statin therapy: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Archives of Internal Medicine*, 166(21), 2307-2313.
- Thomson, D. M., & Winder, W. W. (2009). AMP-activated protein kinase control of fat metabolism in skeletal muscle. *Acta Physiologica (Oxford, England)*, 196(1), 147-154.
- Tontonoz, P., Graves, R. A., Budavari, A. I., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Hu, E., et al. (1994). Adipocyte-specific transcription factor ARF6 is a heterodimeric complex of two nuclear hormone receptors, PPAR gamma and RXR alpha. *Nucleic Acids Research*, 22(25), 5628-5634.
- Tontonoz, P., Hu, E., Graves, R. A., Budavari, A. I., & Spiegelman, B. M. (1994). mPPAR gamma 2: Tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes & Development*, 8(10), 1224-1234.
- Tontonoz, P., Kim, J. B., Graves, R. A., & Spiegelman, B. M. (1993). ADD1: A novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation. *Molecular and Cellular Biology*, 13(8), 4753-4759.
- Towler, M. C., & Hardie, D. G. (2007). AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circulation Research*, 100(3), 328-341.

V

- van Raalte, D. H., Li, M., Pritchard, P. H., & Wasan, K. M. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-alpha: A pharmacological target with a promising future. *Pharmaceutical Research*, 21(9), 1531-1538.
- Vane, J. R., & Botting, R. M. (1998). Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. *Inflammation Research : Official Journal of the European Histamine Research Society ...[Et Al.]*, 47 Suppl 2, S78-87.
- Varanasi, U., Chu, R., Huang, Q., Castellon, R., Yeldandi, A. V., & Reddy, J. K. (1996). Identification of a peroxisome proliferator-responsive element upstream of the human peroxisomal fatty acyl coenzyme A oxidase gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(4), 2147-2155.
- Vazquez, M., Roglans, N., Cabrero, A., Rodriguez, C., Adzet, T., Alegret, M., et al. (2001). Bezafibrate induces acyl-CoA oxidase mRNA levels and fatty acid peroxisomal beta-oxidation in rat white adipose tissue. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 216(1-2), 71-78.
- Vega, R. B., Huss, J. M., & Kelly, D. P. (2000). The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Molecular and Cellular Biology*, 20(5), 1868-1876.
- Viswakarma, N., Jia, Y., Bai, L., Vluggens, A., Borensztajn, J., Xu, J., et al. (2010). Coactivators in PPAR-regulated gene expression. *PPAR Research*, 2010, 250126. Epub 2010 Aug 5.
- Vu-Dac, N., Schoonjans, K., Laine, B., Fruchart, J. C., Auwerx, J., & Staels, B. (1994). Negative regulation of the human apolipoprotein A-I promoter by fibrates can be attenuated by the interaction of the peroxisome proliferator-activated receptor with its response element. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(49), 31012-31018.

BIBLIOGRAFIA

W

- Wagner, K. D., & Wagner, N. (2010). Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (PPARbeta/delta) acts as regulator of metabolism linked to multiple cellular functions. *Pharmacology & Therapeutics*, *125*(3), 423-435.
- Waku, T., Shiraki, T., Oyama, T., Fujimoto, Y., Maebara, K., Kamiya, N., et al. (2009). Structural insight into PPARgamma activation through covalent modification with endogenous fatty acids. *Journal of Molecular Biology*, *385*(1), 188-199.
- Wan, F., & Lenardo, M. J. (2010). The nuclear signaling of NF-kappaB: Current knowledge, new insights, and future perspectives. *Cell Research*, *20*(1), 24-33.
- Wang, H., Syrovets, T., Kess, D., Buchele, B., Hainzl, H., Lunov, O., et al. (2009). Targeting NF-kappa B with a natural triterpenoid alleviates skin inflammation in a mouse model of psoriasis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *183*(7), 4755-4763.
- Wang, Y. X., Lee, C. H., Tiep, S., Yu, R. T., Ham, J., Kang, H., et al. (2003). Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell*, *113*(2), 159-170.
- Wang, Y. X., Zhang, C. L., Yu, R. T., Cho, H. K., Nelson, M. C., Bayuga-Ocampo, C. R., et al. (2004). Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARdelta. *PLoS Biology*, *2*(10), e294.
- Watkins, P. A. (1997). Fatty acid activation. *Progress in Lipid Research*, *36*(1), 55-83.
- Watt, M. J., & Steinberg, G. R. (2008). Regulation and function of triacylglycerol lipases in cellular metabolism. *The Biochemical Journal*, *414*(3), 313-325.
- Westergaard, M., Henningsen, J., Johansen, C., Rasmussen, S., Svendsen, M. L., Jensen, U. B., et al. (2003). Expression and localization of peroxisome proliferator-activated receptors and nuclear factor kappaB in normal and lesional psoriatic skin. *The Journal of Investigative Dermatology*, *121*(5), 1104-1117.

Willson, T. M., Lambert, M. H., & Kliewer, S. A. (2001). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and metabolic disease. *Annual Review of Biochemistry*, 70, 341-367.

Winder, W. W., & Hardie, D. G. (1999). AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: Possible roles in type 2 diabetes. *The American Journal of Physiology*, 277(1 Pt 1), E1-10.

Winder, W. W., Holmes, B. F., Rubink, D. S., Jensen, E. B., Chen, M., & Holloszy, J. O. (2000). Activation of AMP-activated protein kinase increases mitochondrial enzymes in skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, 88(6), 2219-2226.

Winder, W. W., & Thomson, D. M. (2007). Cellular energy sensing and signaling by AMP-activated protein kinase. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 47(3), 332-347.

Witczak, C. A., Sharoff, C. G., & Goodyear, L. J. (2008). AMP-activated protein kinase in skeletal muscle: From structure and localization to its role as a master regulator of cellular metabolism. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 65(23), 3737-3755.

Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., et al. (1999). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*, 98(1), 115-124.

X

Xu, H. E., Lambert, M. H., Montana, V. G., Plunket, K. D., Moore, L. B., Collins, J. L., et al. (2001). Structural determinants of ligand binding selectivity between the peroxisome proliferator-activated receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(24), 13919-13924.

BIBLIOGRAFIA

Y

Yang, S. Y., He, X. Y., & Schulz, H. (2005). 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase and short chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase in human health and disease. *The FEBS Journal*, 272(19), 4874-4883.

Yang, X. D., Tajkhorshid, E., & Chen, L. F. (2010). Functional interplay between acetylation and methylation of the RelA subunit of NF-kappaB. *Molecular and Cellular Biology*, 30(9), 2170-2180.

Yessoufou, A., & Wahli, W. (2010). Multifaceted roles of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) at the cellular and whole organism levels. *Swiss Medical Weekly : Official Journal of the Swiss Society of Infectious Diseases, the Swiss Society of Internal Medicine, the Swiss Society of Pneumology*, 140, w13071.

Yeung, F., Hoberg, J. E., Ramsey, C. S., Keller, M. D., Jones, D. R., Frye, R. A., et al. (2004). Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *The EMBO Journal*, 23(12), 2369-2380.

Z

Zammit, V. A. (1984). Mechanisms of regulation of the partition of fatty acids between oxidation and esterification in the liver. *Progress in Lipid Research*, 23(1), 39-67.

Zammit, V. A. (1999). Carnitine acyltransferases: Functional significance of subcellular distribution and membrane topology. *Progress in Lipid Research*, 38(3), 199-224.

Zammit, V. A., Ramsay, R. R., Bonomini, M., & Arduini, A. (2009). Carnitine, mitochondrial function and therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(14), 1353-1362.

Zenimaru, Y., Takahashi, S., Takahashi, M., Yamada, K., Iwasaki, T., Hattori, H., et al. (2008). Glucose deprivation accelerates VLDL receptor-mediated TG-rich lipoprotein uptake by AMPK activation in skeletal muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 368(3), 716-722.

- Zhang, B. B., Zhou, G., & Li, C. (2009). AMPK: An emerging drug target for diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metabolism*, 9(5), 407-416.
- Zhang, Y., Castellani, L. W., Sinal, C. J., Gonzalez, F. J., & Edwards, P. A. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha) regulates triglyceride metabolism by activation of the nuclear receptor FXR. *Genes & Development*, 18(2), 157-169.
- Zheng, Y., Zhang, W., Pendleton, E., Leng, S., Wu, J., Chen, R., et al. (2009). Improved insulin sensitivity by calorie restriction is associated with reduction of ERK and p70S6K activities in the liver of obese Zucker rats. *The Journal of Endocrinology*, 203(3), 337-347.
- Zhou, Q., & Liao, J. K. (2010). Pleiotropic effects of statins. - basic research and clinical perspectives -. *Circulation Journal : Official Journal of the Japanese Circulation Society*, 74(5), 818-826.
- Zieleniak, A., Wojcik, M., & Wozniak, L. A. (2008). Structure and physiological functions of the human peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis*, 56(5), 331-345.
- Zoete, V., Grosdidier, A., & Michielin, O. (2007). Peroxisome proliferator-activated receptor structures: Ligand specificity, molecular switch and interactions with regulators. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1771(8), 915-925.

ANNEX

***Review Article.* The role of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor β/δ on the Inflammatory Basis of the Metabolic Disease**

Teresa Coll, Emma Barroso, David Álvarez-Guardia, Lucía Serrano, Laia Salvadó, Manuel Merlos, Xavier Palomer i Manuel Vázquez-Carrera

PPAR Research (2010)

La patofisiologia subjacent de molts trastorns metabòlics com l'obesitat, la diabetis mellitus de tipus 2 i l'aterosclerosi impliquen un estat d'inflamació crònica de baixa intensitat. Nombroses evidències mostren la importància dels PPARs com reguladors del metabolisme i la resposta inflamatòria, especialment en relació al síndrome metabòlic. La capacitat d'aquests receptors per connectar metabolisme i inflamació ha fet que hagin estat considerats pel tractament d'aquests trastorns metabòlics. De fet, s'ha demostrat que el receptor nuclear PPAR β/δ pot millorar aquestes patologies en part, a través dels seus efectes antiinflamatoris. Així, l'activació de PPAR β/δ prevé la producció de citokines pro-inflamatòries als adipòcits a més de la seva implicació en la polarització dels macròfags infiltrats al teixit adipós. A més, lligands PPAR β/δ prevenen la inflamació al múscul esquelètic induïda pels àcids grassos, eviten el desenvolupament d'hipertròfia cardíaca i suprimeixen la inflamació derivada dels macròfags en les lesions ateroscleròtiques. Aquestes dades suggereixen que els lligands de PPAR β/δ poden arribar a convertir-se en una opció terapèutica per la prevenció dels trastorns metabòlics amb una base inflamatòria.

Review Article

The Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor β/δ on the Inflammatory Basis of Metabolic Disease

Teresa Coll, Emma Barroso, David Álvarez-Guardia, Lucía Serrano, Laia Salvadó, Manuel Merlos, Xavier Palomer, and Manuel Vázquez-Carrera

Department of Pharmacology and Therapeutic Chemistry, CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM)-Instituto de Salud Carlos III and Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain

Correspondence should be addressed to Manuel Vázquez-Carrera, mvazquezcarrera@ub.edu

Received 20 May 2010; Accepted 28 June 2010

Academic Editor: Marcelo Napimoga

Copyright © 2010 Teresa Coll et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The pathophysiology underlying several metabolic diseases, such as obesity, type 2 diabetes mellitus, and atherosclerosis, involves a state of chronic low-level inflammation. Evidence is now emerging that the nuclear receptor Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) β/δ ameliorates these pathologies partly through its anti-inflammatory effects. PPAR β/δ activation prevents the production of inflammatory cytokines by adipocytes, and it is involved in the acquisition of the anti-inflammatory phenotype of macrophages infiltrated in adipose tissue. Furthermore, PPAR β/δ ligands prevent fatty acid-induced inflammation in skeletal muscle cells, avoid the development of cardiac hypertrophy, and suppress macrophage-derived inflammation in atherosclerosis. These data are promising and suggest that PPAR β/δ ligands may become a therapeutic option for preventing the inflammatory basis of metabolic diseases.

1. Introduction

Over the last decade, an abundance of evidence has shown a close link between a state of chronic low-level inflammation and metabolic dysfunction. In fact, excessive nutrition consumption or storage has the capacity to activate both inflammatory and metabolic signaling networks since they are linked and interdependent [1].

Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs), which are members of the nuclear receptor family, have emerged as important regulators of metabolic and inflammatory signaling, particularly in the context of metabolic disease [2–4]. The ability of these receptors to connect metabolism and inflammation makes them interesting targets for the treatment of metabolic diseases, such as atherosclerosis and diabetes, through modulation of the inflammatory process. Here, we will focus on recent advances in our understanding of the role of one of these PPAR members, the PPAR β/δ , as an integrator of metabolic and inflammatory signaling networks.

2. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs)

PPARs are members of the nuclear receptor superfamily of ligand-activated transcription factors that regulate the expression of genes involved in fatty acid uptake and oxidation, lipid metabolism, and inflammation [2]. To be transcriptionally active, PPARs need to heterodimerize with the 9-*cis* retinoic acid receptor (RXR) (NR2B) (Figure 1). PPAR-RXR heterodimers bind to DNA-specific sequences called peroxisome proliferator-response elements (PPREs), which consist of an imperfect direct repeat of the consensus binding site for nuclear hormone receptors (AGGTCA), separated by one nucleotide (Direct Repeat 1, DR-1). These sequences have been characterized within the promoter regions of PPAR target genes. The binding occurs in such a way that PPAR is always oriented to the DNA's 5'-end, while RXR is oriented to the 3'-end. In the absence of a ligand, high-affinity complexes are formed between PPAR-RXR heterodimers and nuclear receptor corepressor proteins,

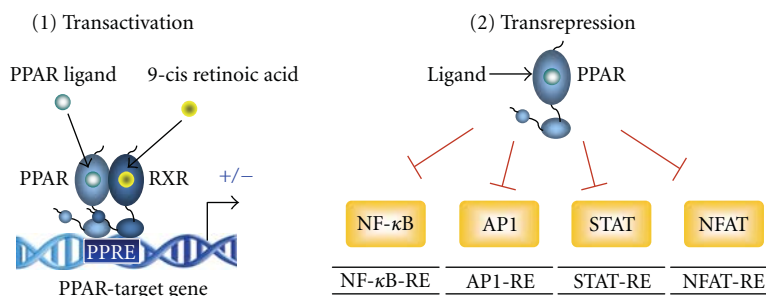


FIGURE 1: Molecular mechanisms of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs). PPARs are ligand-activated transcription factors that regulate gene expression through two mechanisms: transactivation and transrepression. In transactivation, PPAR-RXR heterodimers bind to DNA-specific sequences called peroxisome proliferator-response elements (PPREs), which are located in the promoter regions of genes involved in glucose and fatty acid metabolism. PPARs may also regulate gene expression through a DNA-independent mechanism called transrepression. Through this mechanism, PPARs inhibit the activity of several transcription factors such as Nuclear Factor- κ B, which leads to anti-inflammatory effects. STAT denotes signal transducers and activators of transcription, IS-GFRE is the interferon-stimulated gene factor responsive element, and TRE is the TPA responsive element, where TPA is a phorbol ester.

which block transcriptional activation by sequestering the heterodimer from the promoter.

In a specific cellular context, the activity of PPARs that regulate the transcription of their target genes depends on many factors (relative expression of the PPARs, the promoter context of the target gene, the presence of coactivator, and corepressor proteins, etc.). Thus, the transcriptional activity of PPARs is modulated by coactivators and corepressors [5]. One of the best described PPAR coactivators is PPAR γ coactivator 1 α (PGC-1 α). Silencing mediator for retinoic and thyroid hormone receptor (SMRT) and the nuclear receptor corepressor are corepressors that interact with the PPARs in the absence of ligands [6]. Receptor-interacting protein 140 (RIP140), an important metabolic regulator, is another ligand-dependent corepressor which interacts with PPARs. Binding of the ligand to PPAR induces a conformational change resulting in dissociation of corepressor proteins, so that the PPAR-RXR heterodimer can then bind to PPREs. Moreover, once activated by the ligand, the heterodimer recruits coactivator proteins that promote the initiation of transcription [4]. As a result of these changes in transcriptional activity, binding of ligands to the receptor leads to changes in the expression level of mRNAs encoded by PPAR target genes.

Finally, PPAR activity is also regulated at the posttranscriptional level by phosphorylation, ubiquitinylation, and sumoylation (for a detailed review, see [5]).

However, the regulation of gene transcription by PPARs extends beyond their ability to transactivate specific target genes. PPARs also regulate gene expression independently of binding to PPREs. They cross-talk with other types of transcription factors and influence their function without binding to DNA, through a mechanism termed receptor-dependent *trans*-repression [7]. Most of the anti-inflammatory effects of PPARs can probably be explained in this way [8, 9]. Through this DNA-binding independent mechanism, PPARs suppress the activities of several transcription factors, including nuclear factor κ B (NF- κ B), activator protein 1 (AP-1), signal transducers and

activators of transcription (STATs), and the nuclear factor of activated T cells (NFAT). There are three main transrepression mechanisms by which ligand-activated PPAR-RXR complexes negatively regulate the activities of other transcription factors. First, transrepression may result from competition for limited amounts of shared coactivators. Under conditions in which the levels of specific coactivators are rate-limiting, activation of PPAR may suppress the activity of other transcription factors that use the same coactivators [10, 11]. In the second mechanism, activated PPAR-RXR heterodimers are believed to act through physical interaction with other transcription factors (e.g., AP-1, NF- κ B, NFAT, or STATs). This association prevents the transcription factor from binding to its response element and thereby inhibits its ability to induce gene transcription [12]. The third transrepression mechanism relies on the ability of activated PPAR-RXR heterodimers to inhibit the phosphorylation and activation of certain members of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade [13], which prevents activation of downstream transcription factors.

The PPAR family consists of three members, PPAR α (NR1C1 according to the unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily), PPAR β/δ (NR1C2) and PPAR γ (NR1C3) [14]. PPAR α was the first PPAR to be identified and is the molecular target of the fibrate hypolipidemic class of drugs. This PPAR isotype is expressed primarily in tissues that have a high level of fatty acid catabolism, such as liver, brown fat, kidney, heart, and skeletal muscle [15]. PPAR γ has a restricted pattern of expression, mainly in white and brown adipose tissue and colon, and is also expressed in macrophages. Other tissues, such as skeletal muscle and heart, contain only limited amounts. PPAR β/δ is ubiquitously expressed and for this reason it was initially considered a “housekeeping gene” [16]. However, studies with knockout mice [17–19] and the development of specific and high-affinity ligands for this receptor have shown that PPAR β/δ is a potential molecular target to prevent or treat several metabolic disorders.

Natural ligands for the PPARs are believed to include native and modified polyunsaturated fatty acids and eicosanoids. Since the discovery of PPARs, a number of synthetic ligands for these receptors have been identified [20]. Thus, fibrates activate PPAR α , whereas the antidiabetic drugs thiazolidinediones activate the γ isotype [21, 22].

3. PPAR β/δ -Specific Features and Ligands

The crystal structure of the ligand-binding domain of the PPAR β/δ isotype, which was first cloned in *Xenopus laevis* [23], revealed an exceptionally large pocket of approximately 1300 Å³. This pocket is similar to that of PPAR γ , but much larger than the pockets of other nuclear receptors [24, 25]. This may partially explain the great variety of natural and synthetic ligands that bind to and activate this nuclear receptor. Saturated (14 to 18 carbons) and polyunsaturated (20 carbons in length) fatty acids have affinities for PPAR β/δ in the low micromolar range [25–28]. In addition, all-*trans*-retinoic acid (vitamin A) [29] and fatty acids derived from very low density lipoprotein (VLDL) [30] can activate PPAR β/δ . Finally, the number of experimental studies on the role of PPAR β/δ in cellular processes increased greatly as a result of the availability of several synthetic ligands (including GW501516, GW0742, and L-165041) that activate PPAR β/δ at low concentrations both *in vivo* and *in vitro* and have high selectivity over other PPAR isotypes [31]. The EC₅₀ for these compounds, which were assessed with recombinant human PPAR β/δ , were 1.0 nM for GW0742, 1.1 nM for GW501516, and 50 nM for L-165041 [31, 32]. Recently, the first PPAR β/δ synthetic antagonist (GSK0660) has been identified [33].

4. PPAR β/δ , Inflammation, and Adipose Tissue

The expansion of adipose tissue, mainly in the form of visceral obesity, may contribute to enhanced inflammation in this tissue through several processes. First, macrophages can infiltrate in adipose tissue, which contributes to the overproduction of inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor α (TNF- α) and interleukin 6 (IL-6) [34–36]. Indeed, the infiltration of macrophages into adipose tissue correlates with the degree of insulin resistance [34]. Second, as visceral fat (which is very sensitive to lipolytic stimuli) increases, so does the rate of lipolysis. This leads to increased free fatty acid (FFA) mobilization and elevated levels of circulating FFA. Several studies have consistently demonstrated that elevations of plasma FFA produce insulin resistance in diabetic patients and in nondiabetic subjects [37–39]. Saturated FFA are potent activators of the Toll-like receptor-4 (TLR4) [40] and recent evidence suggests that inflammatory processes induced by obesity and a high-fat diet cause systemic insulin resistance via a mechanism involving this receptor [41]. TLR-4 is expressed in virtually all human cells and binds a wide spectrum of exogenous and endogenous ligands, including bacterial lipopolysaccharide (LPS) [42]. In the presence of LPS, the TLR4 complex (including CD-14 and an accessory protein, MD-2) recruits the adaptor

protein, myeloid differentiation factor-88 (MyD88), which in turn recruits interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK). This leads to the activation of the proinflammatory transcription factor NF- κ B [43] and the subsequent enhanced expression of several inflammatory mediators (including IL-6 and monocyte chemoattractant protein-1 [MCP-1]). These observations indicate that saturated FFA derived from adipocytes and from high-fat diets activate TLR and the inflammatory pathway in adipocytes and macrophages, which contribute to the synthesis and production of cytokines such as TNF- α [44]. In addition, high-fat diets raise plasma LPS to a concentration that is high enough to increase body weight, fasting glycemia, and inflammation [45]. Furthermore, LPS receptor-deleted mice (CD14 mutants) are hypersensitive to insulin, and the development of insulin resistance, obesity, and diabetes in this animal model is delayed in response to a high-fat diet [45]. Experiments performed in our laboratory have demonstrated that the PPAR β/δ agonist GW501516 inhibits LPS-induced cytokine expression and secretion by preventing NF- κ B activation in adipocytes [46]. Of note, NF- κ B activation by LPS requires mitogen-activated protein kinase (MAPK)-extracellular signal-related kinase (ERK)1/2 (MEK1/2) activation, since inhibition of this pathway reduces LPS-induced cytokine production in adipocytes [47]. In agreement with this role of ERK1/2 in inflammation in adipocytes, the expression of proinflammatory cytokines in these cells drops when they are exposed to LPS in the presence of the MAPK pathway inhibitor U0126. Interestingly, in white adipose tissue from PPAR β/δ -null mice we observed increased ERK1/2 phosphorylation and NF- κ B activity and higher expression of IL-6 compared with wild-type mice [46]. Moreover, in the white adipose tissue of a genetic model of obesity and diabetes, the Zucker diabetic fatty (ZDF) rat, the reduction in the expression of PPAR β/δ correlated with an increase in ERK1/2 phosphorylation and NF- κ B activity. These findings suggest that PPAR β/δ activation prevents LPS-induced NF- κ B activation via ERK1/2, thereby reducing the production of proinflammatory cytokines involved in the development of insulin resistance.

In addition, PPAR β/δ is involved in the phenotypic switch of adipose tissue-resident macrophages that modulates insulin sensitivity [48]. Thus, it has been suggested that macrophages infiltrated in adipose tissue from lean animals show an alternatively activated M2 phenotype [49] that is induced by Th2 cytokines, such as IL-4 and IL-13. These macrophages produce IL-10, a cytokine that inhibits inflammation [50]. In contrast, high-fat diets lead to infiltration of macrophages that show markers of classic activation by Th1 cytokines, such as TNF- α and IL-1 β . These M1 phenotypic macrophages produce proinflammatory cytokines that lead to metabolic disturbances. In infiltrated macrophages in adipose tissue and liver, the signaling of Th2 cytokines is transduced by PPAR β/δ through a signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6) binding site on its promoter, which induces alternative activation. The subsequent switch to the M2 phenotype prevents the inflammation caused by inflammatory mediators, such as FFA, in adipose tissue and liver. In agreement with this

model, myeloid-specific PPAR β/δ ^{-/-} mice show adipocyte dysfunction, insulin resistance, and hepatosteatosis [48].

5. PPAR β/δ , Inflammation, and Insulin Resistance in Skeletal Muscle Cells

FFAs may cause insulin resistance in skeletal muscle through several mechanisms, including effects on metabolism [51, 52], signaling [53, 54], and mitochondrial function [55, 56]. In addition, FFAs activate proinflammatory pathways, linking the development of this pathology to a chronic low-grade systemic inflammatory response [57]. In addition to FFA-induced inflammation through TLR, an additional pathway leads to FFA-mediated inflammation. This pathway involves intracellular accumulation of fatty acid derivatives. Once fatty acids are taken up by skeletal muscle cells they are either stored as fatty acid derivatives or undergo β -oxidation in the mitochondria. In the presence of high plasma FFA, fatty acid flux in skeletal muscle cells exceeds its oxidation, which leads to the accumulation of fatty acid derivatives, such as diacylglycerol (DAG), which can then activate a number of different serine kinases that negatively regulate insulin action. Thus, DAG is a potent allosteric activator of protein kinase C θ (PKC θ), which is the most abundant PKC isoform in skeletal muscle [58–60]. This PKC isoform inhibits the action of insulin by phosphorylating certain serine residues on insulin receptor substrate 1 (IRS1), including Ser³⁰⁷ in the rodent IRS-1 protein (reviewed in [61]). This phosphorylation impairs insulin-receptor signaling through several distinct mechanisms [62]. PKC θ also impairs insulin sensitivity by activating another serine kinase, I κ B kinase β (IKK β) [63]. In addition to phosphorylating IRS-1 in Ser³⁰⁷, IKK β phosphorylates I κ B. Thus, it activates the proinflammatory transcription factor NF- κ B, which has been linked to fatty acid-induced impairment of insulin action in skeletal muscle in rodents [64, 65]. Once activated, NF- κ B regulates the expression of multiple inflammatory mediators, including IL-6. This cytokine correlates strongly with insulin resistance and type 2 diabetes [66–68] and its plasma levels are 2–3 times higher in patients with obesity and type 2 diabetes than in lean control subjects [67].

Accumulation of fatty acid derivatives can be attenuated by mitochondrial β -oxidation. The rate-limiting step for β -oxidation of long-chain fatty acids is their transport into mitochondria via carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT-1). The activity of this enzyme is inhibited by malonyl-CoA, the product of acetyl-CoA carboxylase, which, in turn, is inhibited by the AMP-activated protein kinase (AMPK). This kinase is a metabolic sensor that detects low ATP levels and increases oxidative metabolism [69], by reducing the levels of malonyl-CoA. Interestingly, activation of fatty acid oxidation by overexpressing CPT-1 in cultured skeletal muscle cells [70] and in mouse skeletal muscle [71] improves lipid-induced insulin resistance. Hence, this approach may provide a valid therapeutic strategy to prevent this pathology. Activation of PPAR β/δ by its ligands (including GW501516) enhances fatty acid catabolism in adipose tissue and skeletal muscle, thereby delaying weight gain (for

a review, see [72]). This increase in fatty acid oxidation in human skeletal muscle cells following PPAR β/δ activation by GW501516 is dependent on both PPAR β/δ and AMPK [73]. AMPK is activated by GW501516 by modulating the ATP:AMP ratio [73]. Despite these data, little information was available on whether the increase in fatty acid oxidation attained after PPAR β/δ activation prevented fatty acid-induced inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells. However, we have recently reported that the PPAR β/δ ligand GW501516 prevented palmitate-induced inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells [74]. Treatment with GW501516 enhanced the expression of two well known PPAR β/δ -target genes involved in fatty acid oxidation, CPT-1 and pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK-4), and increased the phosphorylation of AMPK (Figure 2). This prevented the reduction in fatty acid oxidation caused by palmitate exposure. In agreement with these changes, GW501516 treatment reversed the increase in DAG and PKC θ activation caused by palmitate. These effects were abolished in the presence of the CPT-1 inhibitor etomoxir, thereby implicating increased fatty acid oxidation in the changes. Consistent with these findings, PPAR β/δ activation by GW501516 blocked palmitate-induced NF- κ B DNA-binding activity. Likewise, drug treatment inhibited the increase in IL-6 expression caused by palmitate in C2C12 myotubes and human skeletal muscle cells, as well as the protein secretion of this cytokine. Overall, these findings indicate that PPAR β/δ attenuates fatty acid-induced NF- κ B activation and the subsequent development of insulin resistance in skeletal muscle cells by reducing DAG accumulation. To our knowledge no studies have assessed whether this mechanism operates in humans. However, since GW501516 increases CPT-1 expression and palmitate oxidation in human skeletal muscle [75, 76], this possibility merits further exploration.

6. PPAR β/δ , Inflammation, and Heart Function

The constant pumping of the heart requires a high energy supply, which is mainly met by fatty acids and glucose. The oxidation of fatty acids and glucose covers 65% and 30% of the energy demand of the adult heart, respectively [77]. The heart, in contrast to other tissues such as the brain, adapts its metabolism to substrate availability. For example, an increase in glucose utilization and a decrease in fatty acid oxidation is observed during cardiac hypertrophy and congestive heart failure [78–80]. PPAR β/δ is involved in the control of fatty acid oxidation in heart, which is similar to its role in skeletal muscle. We have reported that the levels of both PPAR α and PPAR β/δ are reduced in pressure-overload cardiac hypertrophy [81]. Therefore, the fall in the expression of both PPAR subtypes during the development of cardiac hypertrophy may be necessary to downregulate the expression of genes involved in fatty acid metabolism. Interestingly, the changes that cardiac hypertrophy causes in the expression of genes involved in fatty acid metabolism were not observed when NF- κ B activity was inhibited [82]. These data pointed to the involvement of NF- κ B in the changes. Therefore, we evaluated whether mechanisms

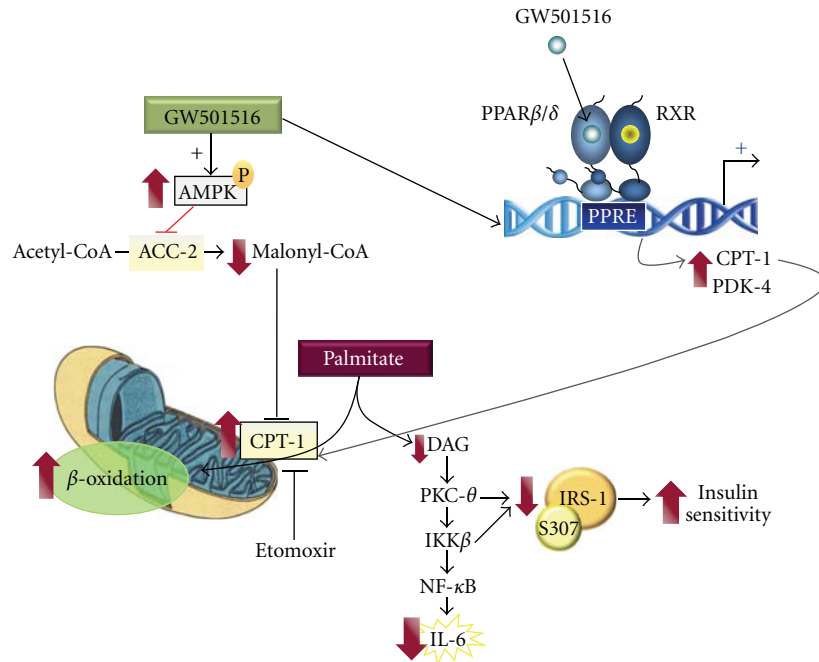


FIGURE 2: Potential mechanism of action involved in the reduction of insulin resistance and inflammation in skeletal muscle cells following PPAR β/δ activation by GW501516. ACC-2, acetyl-CoA carboxylase 2; AMPK, AMP-activated protein kinase; CPT-1, carnitine palmitoyltransferase-1; DAG, diacylglycerol; IKK β , I κ B kinase β ; IL-6, interleukin 6; IRS-1, Insulin Receptor Substrate 1; NF- κ B, Nuclear Factor- κ B; PDK-4, pyruvate dehydrogenase kinase 4; PKC θ , protein kinase C θ .

such as protein-protein interaction between NF- κ B and PPAR contribute to the changes in the expression of genes involved in cardiac fatty acid metabolism, in addition to the reported reduction in the expression of PPARs during cardiac hypertrophy [83]. Using both *in vitro* and *in vivo* models of cardiac hypertrophy, we studied the contribution of NF- κ B activation to the downregulation of fatty acid oxidation during this process. Stimulation of rat neonatal cardiomyocytes with phenylephrine (PE), which leads to NF- κ B activation [84], caused cardiac hypertrophy that was accompanied by a fall in the expression of PDK-4 and palmitate oxidation. Furthermore, the reduction in the expression of PDK-4 and fatty acid oxidation observed in PE-stimulated rat neonatal cardiomyocytes was restored by NF- κ B inhibitors. These findings and additional studies [85] pointed to the involvement of NF- κ B in the downregulation of fatty acid oxidation during the development of cardiac hypertrophy. In agreement with this idea, a study demonstrated that cardiomyocyte-restricted PPAR β/δ deletion in heart of mice reduced myocardial fatty acid oxidation and the mRNA expression of genes involved in this process, such as PDK-4, and led to cardiomyopathy [86]. The mechanism by which activation of NF- κ B results in reduced expression of PPAR β/δ target genes seems to involve reduced interaction of this PPAR subtype with its *cis*-regulatory element, since NF- κ B activation caused a dramatic reduction in the binding of PPAR β/δ protein to the PPRE probe. This reduction was partially reversed by co-incubation of the cells with NF- κ B inhibitors, which

confirms the involvement of this transcription factor in the changes observed. Therefore, the reduced binding activity of PPAR β/δ seems to be related to the activation of NF- κ B in cardiac cells. However, the mechanism by which NF- κ B activation prevented the interaction of PPAR β/δ with its response element still had to be established. NF- κ B is present in the cytoplasm as an inactive heterodimer that consists mostly of the p50 and p65 subunits. However, after activation, this heterodimer translocates to the nucleus and regulates the expression of genes involved in inflammatory and immune processes. Our results indicated that once the p65 subunit of NF- κ B reaches the nucleus it interacts with PPAR β/δ . This association prevents PPAR β/δ from binding to its response element, and thereby inhibits its ability to induce gene transcription, which leads to a reduction in the expression of PDK-4. In a recent study it has also been reported that PPAR β/δ ligands and overexpression of this nuclear receptor suppressed myocardial inflammatory responses, such as the lipopolysaccharide-mediated production of TNF α . This had beneficial effects on animals that had undergone ischemia/reperfusion injury or cardiac hypertrophy [87].

7. PPAR β/δ , Inflammation, and Atherosclerosis

There is a strong relationship between circulating lipoproteins and atherosclerosis, since modified LDL-cholesterol particles are taken up by monocyte-derived macrophages,

which leads to the formation of what are known as foam cells in the arterial intimal wall. Furthermore, these macrophages contribute to the inflammatory reaction by the production and secretion of numerous proinflammatory cytokines [88].

Treatment of obese rhesus monkeys, which are a model for human obesity and its associated metabolic disorders, with the PPAR β/δ agonist GW501516 increased HDL-cholesterol (79%), and decreased triglycerides (56%), LDL-cholesterol (29%), and fasting insulin levels (48%) [22]. A decrease in proatherogenic small dense LDL was also observed in treated animals [89]. It has been suggested that the increase in HDL-cholesterol levels after PPAR β/δ treatment is caused by enhanced cholesterol efflux, which is stimulated by higher expression of the reverse cholesterol transporter ATP-binding cassette A1 (ABCA1) in several tissues, including human and mouse macrophages and intestinal cells and fibroblasts [90, 91]. Apart from these beneficial effects of PPAR β/δ activation on HDL levels, treatment with this compound also increased HDL particle size in primates [92]. This effect is thought to be protective against the progression of coronary artery disease in humans [93]. In addition, PPAR β/δ activation reduces cholesterol absorption through a mechanism that may at least partly involve reduced intestinal expression of Niemann-Pick C1-like 1 (*Npc1l1*), which is the proposed target for ezetimibe, an inhibitor of cholesterol absorption [91]. Furthermore, deletion of PPAR β/δ in mice led to enhanced LDL and triglyceride levels [94]. The administration of a PPAR β/δ agonist to obese and diabetic *db/db* mice slightly increased HDL particles, without affecting triglyceride levels [90]. In a shorter treatment with GW501516, a reduction in plasma free fatty acids and triglyceride levels was observed in *db/db* mice, but not in mice exposed to a high-fat diet [95]. In humans, there are conflicting reports on whether PPAR β/δ polymorphisms are associated with changes in plasma lipoproteins. Thus, while some authors found an association between a PPAR β/δ polymorphism and plasma lipids [96], this was not confirmed by others [97]. These discrepancies could be caused by differences in sex or the influence of gene-environment interactions, since a recent study reported that the association between the PPAR β/δ -87T>C polymorphism and plasma HDL-cholesterol might be sex-specific, with women showing a stronger association. This association was only observed in subjects consuming a low-fat diet [98]. The authors concluded that the presence of the PPAR β/δ -87T>C polymorphism, which may result in enhanced PPAR β/δ activity, is associated with lower risk of suffering from metabolic syndrome and that this association depends on the amount of fat consumed. In summary, the findings that are currently available on the effects of PPAR β/δ activation on lipoprotein metabolism are so promising that PPAR β/δ drugs are now in clinical trials for the treatment of human dyslipidemia.

During the development of atherosclerosis, macrophages contribute to inflammation by producing and secreting numerous proinflammatory cytokines [99]. Activated macrophages express the three PPAR isotypes. Whereas the roles of the PPAR α and γ isotypes in macrophage cholesterol homeostasis are well established, the role of

PPAR β/δ remains controversial. Oliver et al. [100] showed that treatment of THP-1 human monocytes with the PPAR β/δ ligand GW501516 enhanced the expression of the reverse cholesterol transporter ABCA1 and induced apoA1-specific cholesterol efflux. Opposite findings were reported by Vosper et al. [101]. They found that treatment with a different PPAR β/δ ligand promoted lipid accumulation in human macrophages (THP-1) exposed to oxidized LDL by increasing the expression of the class A and B scavenger receptors (SR-A and CD-36) and the lipid storage-related genes *aP2* and *adipophilin* [101]. Finally, two studies showed that cholesterol efflux or accumulation was not affected by PPAR β/δ depletion or by PPAR β/δ ligands in murine macrophages [102, 103]. Collectively, these findings suggest that PPAR β/δ does not affect cholesterol metabolism in mice. However, additional studies are needed to establish the role of this nuclear receptor in human macrophage cholesterol metabolism.

It is accepted that inflammation links dyslipidemia to atherosclerotic plaque formation [104]. Several studies have described a role for PPAR β/δ in inflammation in atherosclerosis. For instance, atherosclerosis-prone LDL receptor-null mice transplanted with bone marrow from PPAR β/δ -deficient mice and fed a high-cholesterol diet showed smaller vascular lesions (50% reduction) than wild-type recipient controls [102], whereas no significant differences between the two groups were found for plasma cholesterol levels. However, PPAR β/δ -null macrophages had lower expression of the inflammation markers MCP-1, interleukin 1 β (IL-1 β), and metalloproteinase 9 (MMP-9) [102]. In contrast, PPAR β/δ ligands suppressed the expression of these inflammation markers in wild-type macrophages. These findings led to the suggestion that PPAR β/δ regulates an inflammatory switch by binding or releasing the anti-inflammatory transcriptional suppressor protein B cell lymphoma-6 (BCL-6) [72, 102]. In the absence of the ligand, PPAR β/δ sequesters BCL-6, which leads to inflammation. However, in the presence of the ligand, PPAR β/δ releases BCL-6, which then represses inflammatory gene expression. Similarly, deletion of PPAR β/δ also releases BCL-6, which has anti-inflammatory effects. Therefore, this mechanism may explain how both PPAR β/δ activation and the deletion of this nuclear receptor result in a similar reduction of inflammation. Whether additional mechanisms may contribute to the anti-inflammatory effect of the PPAR β/δ isotype remains to be studied. It should be noted that part of the anti-inflammatory effects of PPAR γ agonists used at high concentrations in macrophages has been attributed to the activation of PPAR β/δ [105], since at high concentrations, PPAR γ ligands may activate both PPAR isotypes. Although these findings indicate that PPAR β/δ activation may be beneficial in the treatment of atherosclerosis, *in vivo* studies are contradictory. Thus, Li et al. [103] reported no effect of the PPAR β/δ agonist GW0742 on atherosclerotic lesion size in male LDL $^{-/-}$ mice fed an atherogenic diet (1.25% cholesterol). In contrast, Graham et al. [106] reported that administration of GW0742 to female LDL $^{-/-}$ mice fed an atherogenic diet (0.25% cholesterol) reduced atherosclerosis by 30%. Differences between these two studies

(sex, cholesterol supplementation, or drug doses) may explain the contradictory results. Overall, these data suggest that PPAR β/δ agonists have anti-inflammatory effects *in vivo*, but not sufficient to inhibit the development of atherosclerosis in extreme hypercholesterolemic animal models of the disease. Additional studies will be needed to determine the exact role of PPAR β/δ in modulating the development of atherosclerosis can be determined.

8. Concluding Remarks

The treatment and prevention of obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus requires lifestyle changes, including weight reduction, increased physical activity and diet. However, many patients cannot control these pathologies with lifestyle modification and there is a need for drugs to manage them. Activation of PPAR β/δ may become a pharmacological strategy for treating these disorders. This treatment improves atherogenic dyslipidemia by reducing plasma triglyceride levels and enhancing plasma HDL-cholesterol levels. PPAR β/δ also regulates the availability of BCL-6, an inflammatory suppressor protein that is released upon ligand binding to PPAR β/δ , thereby behaving as an “anti-inflammatory switch” to control macrophage-elicited inflammation and atherogenesis. In skeletal muscle, PPAR β/δ ligands may also upregulate fatty acid transport and oxidation, which reduces fatty acid-induced inflammation and insulin resistance. In adipose tissue, they prevent the activation of NF- κ B by reducing the production of inflammatory cytokines. In addition, PPAR β/δ activation in the heart prevents cardiac hypertrophy and improves cardiomyopathy.

As with any drug designed for human therapy, a great deal of research will be needed on the efficacy and safety of PPAR β/δ activators before they reach clinical use. For instance, the ability of PPAR β/δ activators to raise HDL-cholesterol levels in rodents has been demonstrated in primates, but the effects of these drugs on the prevention of obesity in rodents were not observed in primates. This suggests that weight reduction caused by PPAR β/δ ligands in mice depends on their effects on thermogenesis, which is a minor mechanism of energy expenditure in humans and primates. Safety issues have also been raised regarding the connection between PPAR β/δ ligands and carcinogenesis, particularly in animal models [107–110]. However, synthetic PPAR γ and α ligands induce carcinogenesis in rodents, but do not present these effects in humans [111, 112]. In summary, clinical studies are required to determine the efficacy and safety of PPAR β/δ ligands.

Acknowledgments

The authors' work summarized in this paper was supported by Grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain (SAF2006-01475 and SAF2009-06939). CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM) is an Instituto de Salud Carlos III project. T. Coll and L. Serrano were supported by grants from the Ministerio de

Ciencia e Innovación of Spain. We thank the Language Advisory Service of the University of Barcelona for his helpful assistance.

References

- [1] J. Plutzky, “Expansion and contraction: the mighty, mighty fatty acid,” *Nature Medicine*, vol. 15, no. 6, pp. 618–619, 2009.
- [2] S. Kersten, B. Desvergne, and W. Wahli, “Roles of PPARs in health and disease,” *Nature*, vol. 405, no. 6785, pp. 421–424, 2000.
- [3] A. Castrillo and P. Tontonoz, “Nuclear receptors in macrophage biology: at the crossroads of lipid metabolism and inflammation,” *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, vol. 20, pp. 455–480, 2004.
- [4] G. Chinetti, J.-C. Fruchart, and B. Staels, “Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation,” *Inflammation Research*, vol. 49, no. 10, pp. 497–505, 2000.
- [5] J. N. Feige, L. Gelman, L. Michalik, B. Desvergne, and W. Wahli, “From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions,” *Progress in Lipid Research*, vol. 45, no. 2, pp. 120–159, 2006.
- [6] I. Zamir, J. Zhang, and M. A. Lazar, “Stoichiometric and steric principles governing repression by nuclear hormone receptors,” *Genes and Development*, vol. 11, no. 7, pp. 835–846, 1997.
- [7] R. A. Daynes and D. C. Jones, “Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity,” *Nature Reviews Immunology*, vol. 2, no. 10, pp. 748–759, 2002.
- [8] Y. Kamei, L. Xu, T. Heinzel et al., “A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors,” *Cell*, vol. 85, no. 3, pp. 403–414, 1996.
- [9] M. Li, G. Pascual, and C. K. Glass, “Peroxisome proliferator-activated receptor γ -dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene,” *Molecular and Cellular Biology*, vol. 20, no. 13, pp. 4699–4707, 2000.
- [10] P. Delerive, K. De Bosscher, S. Besnard et al., “Peroxisome proliferator-activated receptor α negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF- κ B and AP-1,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 45, pp. 32048–32054, 1999.
- [11] P. Delerive, F. Martin-Nizard, G. Chinetti et al., “Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit thrombin-induced endothelin-1 production in human vascular endothelial cells by inhibiting the activator protein-1 signaling pathway,” *Circulation Research*, vol. 85, no. 5, pp. 394–402, 1999.
- [12] P. Desreumaux, L. Dubuquoy, S. Nutten et al., “Attenuation of colon inflammation through activators of the retinoid X receptor (RXR)/peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) heterodimer. A basis for new therapeutic strategies,” *Journal of Experimental Medicine*, vol. 193, no. 7, pp. 827–838, 2001.
- [13] T. E. Johnson, M. K. Holloway, R. Vogel et al., “Structural requirements and cell-type specificity for ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptors,” *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 63, no. 1–3, pp. 1–8, 1997.
- [14] J. Auwerx, E. Baulieu, M. Beato et al., “A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily,” *Cell*, vol. 97, no. 2, pp. 161–163, 1999.

- [15] O. Braissant, F. Fougère, C. Scotto, M. Dauça, and W. Wahli, "Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR- α , - β , and - γ in the adult rat," *Endocrinology*, vol. 137, no. 1, pp. 354–366, 1996.
- [16] S. A. Kliewer, B. M. Forman, B. Blumberg et al., "Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 91, no. 15, pp. 7355–7359, 1994.
- [17] Y. Barak, D. Liao, W. He et al., "Effects of peroxisome proliferator-activated receptor δ on placentation, adiposity, and colorectal cancer," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, no. 1, pp. 303–308, 2002.
- [18] J. M. Peters, S. S. T. Lee, W. Li et al., "Growths, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor $\beta(\delta)$," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 20, no. 14, pp. 5119–5128, 2000.
- [19] N. S. Tan, L. Michalik, N. Noy et al., "Critical roles of PPAR β/δ in keratinocyte response to inflammation," *Genes and Development*, vol. 15, no. 24, pp. 3263–3277, 2001.
- [20] L. Michalik, J. Auwerx, J. P. Berger et al., "International union of pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors," *Pharmacological Reviews*, vol. 58, no. 4, pp. 726–741, 2006.
- [21] T. M. Willson, M. H. Lambert, and S. A. Kliewer, "Peroxisome proliferator-activated receptor γ and metabolic disease," *Annual Review of Biochemistry*, vol. 70, pp. 341–367, 2001.
- [22] W. R. Oliver Jr., J. L. Shenk, M. R. Snaith et al., "A selective peroxisome proliferator-activated receptor δ agonist promotes reverse cholesterol transport," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 98, no. 9, pp. 5306–5311, 2001.
- [23] C. Dreyer, G. Krey, H. Keller, F. Givel, G. Helftenbein, and W. Wahli, "Control of the peroxisomal β -oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors," *Cell*, vol. 68, no. 5, pp. 879–887, 1992.
- [24] I. Takada, R. T. Yu, H. E. Xu et al., "Alteration of a single amino acid in peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR α) generates a PPAR δ phenotype," *Molecular Endocrinology*, vol. 14, no. 5, pp. 733–740, 2000.
- [25] H. E. Xu, M. H. Lambert, V. G. Montana et al., "Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors," *Molecular Cell*, vol. 3, no. 3, pp. 397–403, 1999.
- [26] B. M. Forman, B. Ruan, J. Chen, G. J. Schroepfer Jr., and R. M. Evans, "The orphan nuclear receptor LXRA is positively and negatively regulated by distinct products of mevalonate metabolism," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, no. 20, pp. 10588–10593, 1997.
- [27] K. Yu, W. Bayona, C. B. Kallen et al., "Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptors by eicosanoids," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 270, no. 41, pp. 23975–23983, 1995.
- [28] G. Krey, O. Braissant, F. L'Horsset et al., "Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay," *Molecular Endocrinology*, vol. 11, no. 6, pp. 779–791, 1997.
- [29] N. Shaw, M. Elholm, and N. Noy, "Retinoic acid is a high affinity selective ligand for the peroxisome proliferator-activated receptor β/δ ," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 43, pp. 41589–41592, 2003.
- [30] A. Chawla, C.-H. Lee, Y. Barak et al., "PPAR δ is a very low-density lipoprotein sensor in macrophages," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 3, pp. 1268–1273, 2003.
- [31] M. L. Sznaidman, C. D. Haffner, P. R. Maloney et al., "Novel selective small molecule agonists for peroxisome proliferator-activated receptor δ (PPAR δ)—synthesis and biological activity," *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, vol. 13, no. 9, pp. 1517–1521, 2003.
- [32] J. Berger, M. D. Leibowitz, T. W. Doebber et al., "Novel peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ and PPAR δ ligands produce distinct biological effects," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 10, pp. 6718–6725, 1999.
- [33] B. G. Shearer, D. J. Steger, J. M. Way et al., "Identification and characterization of a selective peroxisome proliferator-activated receptor β/δ (NR1C2) antagonist," *Molecular Endocrinology*, vol. 22, no. 2, pp. 523–529, 2008.
- [34] P. Mathieu, I. Lemieux, and J. P. Despres, "Obesity, inflammation, and cardiovascular risk," *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, vol. 87, no. 4, pp. 407–416, 2010.
- [35] K. L. Spalding, E. Arner, P. O. Westermark et al., "Dynamics of fat cell turnover in humans," *Nature*, vol. 453, no. 7196, pp. 783–787, 2008.
- [36] B. Gustafson, S. Gogg, S. Hedjazifar, L. Jenndahl, A. Hammarstedt, and U. Smith, "Inflammation and impaired adipogenesis in hypertrophic obesity in man," *American Journal of Physiology*, vol. 297, no. 5, pp. E999–E1003, 2009.
- [37] M. Roden, T. B. Price, G. Perseghin et al., "Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 97, pp. 2859–2865, 1996.
- [38] G. Boden, "Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM," *Diabetes*, vol. 46, no. 1, pp. 3–10, 1997.
- [39] G. Boden, F. Jadali, J. White et al., "Effects of fat on insulin-stimulated carbohydrate metabolism in normal men," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 88, no. 3, pp. 960–966, 1991.
- [40] P. Mathieu, P. Pibarot, and J.-P. Després, "Metabolic syndrome: the danger signal in atherosclerosis," *Vascular Health and Risk Management*, vol. 2, no. 3, pp. 285–302, 2006.
- [41] H. Shi, M. V. Kokoeva, K. Inouye, I. Tzamelis, H. Yin, and J. S. Flier, "TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 116, no. 11, pp. 3015–3025, 2006.
- [42] S. Akira, S. Uematsu, and O. Takeuchi, "Pathogen recognition and innate immunity," *Cell*, vol. 124, no. 4, pp. 783–801, 2006.
- [43] S. E. Shoelson, J. Lee, and A. B. Goldfine, "Inflammation and insulin resistance," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 116, no. 7, pp. 1793–1801, 2006.
- [44] M. T. A. Nguyen, S. Favelyukis, A.-K. Nguyen et al., "A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, no. 48, pp. 35279–35292, 2007.
- [45] P. D. Cani, J. Amar, M. A. Iglesias et al., "Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance," *Diabetes*, vol. 56, no. 7, pp. 1761–1772, 2007.

- [46] R. Rodríguez-Calvo, L. Serrano, T. Coll et al., "Activation of peroxisome proliferator-activated receptor β/δ inhibits lipopolysaccharide-induced cytokine production in adipocytes by lowering nuclear factor- κ B activity via extracellular signal-related kinase 1/2," *Diabetes*, vol. 57, no. 8, pp. 2149–2157, 2008.
- [47] S. Chung, K. LaPoint, K. Martinez, A. Kennedy, M. B. Sandberg, and M. K. McIntosh, "Preadipocytes mediate lipopolysaccharide-induced inflammation and insulin resistance in primary cultures of newly differentiated human adipocytes," *Endocrinology*, vol. 147, no. 11, pp. 5340–5351, 2006.
- [48] K. Kang, S. M. Reilly, V. Karabacak et al., "Adipocyte-derived Th2 cytokines and myeloid PPAR δ regulate macrophage polarization and insulin sensitivity," *Cell Metabolism*, vol. 7, no. 6, pp. 485–495, 2008.
- [49] C. N. Lumeng, S. M. Deyoung, and A. R. Saltiel, "Macrophages block insulin action in adipocytes by altering expression of signaling and glucose transport proteins," *American Journal of Physiology*, vol. 292, no. 1, pp. E166–E174, 2007.
- [50] S. Gordon, "Alternative activation of macrophages," *Nature Reviews Immunology*, vol. 3, no. 1, pp. 23–35, 2003.
- [51] M. Roden, G. Perseghin, K. F. Petersen et al., "The roles of insulin and glucagon in the regulation of hepatic glycogen synthesis and turnover in humans," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 97, no. 3, pp. 642–648, 1996.
- [52] E. P. Haber, S. M. Hirabara, A. D. Gomes, R. Curi, A. R. Carpinelli, and C. R. O. Carvalho, "Palmitate modulates the early steps of insulin signalling pathway in pancreatic islets," *FEBS Letters*, vol. 544, no. 1–3, pp. 185–188, 2003.
- [53] S. M. Hirabara, L. R. Silveira, F. Abdulkader, C. R. O. Carvalho, J. Procopio, and R. Curi, "Time-dependent effects of fatty acids on skeletal muscle metabolism," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 210, no. 1, pp. 7–15, 2007.
- [54] L. R. Silveira, J. Fiamoncini, S. M. Hirabara et al., "Updating the effects of fatty acids on skeletal muscle," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 217, no. 1, pp. 1–12, 2008.
- [55] P. Schrauwen, V. Schrauwen-Hinderling, J. Hoeks, and M. K. C. Hesselink, "Mitochondrial dysfunction and lipotoxicity," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1801, no. 3, pp. 266–271, 2009.
- [56] S. M. Hirabara, R. Curi, and P. Maechler, "Saturated fatty acid-induced insulin resistance is associated with mitochondrial dysfunction in skeletal muscle cells," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 222, no. 1, pp. 187–194, 2010.
- [57] K. E. Wellen and G. S. Hotamisligil, "Inflammation, stress, and diabetes," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 115, no. 5, pp. 1111–1119, 2005.
- [58] M. E. Griffin, M. J. Marcucci, G. W. Cline et al., "Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C θ and alterations in the insulin signaling cascade," *Diabetes*, vol. 48, no. 6, pp. 1270–1274, 2000.
- [59] R. N. Cortright, J. L. Azevedo Jr., Q. Zhou et al., "Protein kinase C modulates insulin action in human skeletal muscle," *American Journal of Physiology*, vol. 278, no. 3, pp. E553–E562, 2000.
- [60] S. I. Itani, Q. Zhou, W. J. Pories, K. G. MacDonald, and G. L. Dohm, "Involvement of protein kinase C in human skeletal muscle insulin resistance and obesity," *Diabetes*, vol. 49, no. 8, pp. 1353–1358, 2000.
- [61] P. Gual, Y. Le Marchand-Brustel, and J.-F. Tanti, "Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation," *Biochimie*, vol. 87, no. 1, pp. 99–109, 2005.
- [62] G. S. Hotamisligil, P. Peraldi, A. Budavari, R. Ellis, M. F. White, and B. M. Spiegelman, "IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance," *Science*, vol. 271, no. 5249, pp. 665–668, 1996.
- [63] G. Perseghin, K. Petersen, and G. I. Shulman, "Cellular mechanism of insulin resistance: potential links with inflammation," *International Journal of Obesity*, vol. 27, supplement 3, pp. S6–S11, 2003.
- [64] J. K. Kim, Y.-J. Kim, J. J. Fillmore et al., "Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 108, no. 3, pp. 437–446, 2001.
- [65] M. Yuan, N. Konstantopoulos, J. Lee et al., "Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikk β ," *Science*, vol. 293, no. 5535, pp. 1673–1677, 2001.
- [66] J. C. Pickup, M. B. Mattock, G. D. Chusney, and D. Burt, "NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X," *Diabetologia*, vol. 40, no. 11, pp. 1286–1292, 1997.
- [67] P. A. Kern, S. Ranganathan, C. Li, L. Wood, and G. Ranganathan, "Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance," *American Journal of Physiology*, vol. 280, no. 5, pp. E745–E751, 2001.
- [68] A. D. Pradhan, J. E. Manson, N. Rifai, J. E. Buring, and P. M. Ridker, "C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus," *Journal of the American Medical Association*, vol. 286, no. 3, pp. 327–334, 2001.
- [69] R. M. Reznick and G. I. Shulman, "The role of AMP-activated protein kinase in mitochondrial biogenesis," *Journal of Physiology*, vol. 574, no. 1, pp. 33–39, 2006.
- [70] D. Sebastián, L. Herrero, D. Serra, G. Asins, and F. G. Hegardt, "CPT I overexpression protects L6E9 muscle cells from fatty acid-induced insulin resistance," *American Journal of Physiology*, vol. 292, no. 3, pp. E677–E686, 2007.
- [71] C. R. Bruce, A. J. Hoy, N. Turner et al., "Overexpression of carnitine palmitoyltransferase-1 in skeletal muscle is sufficient to enhance fatty acid oxidation and improve high-fat diet-induced insulin resistance," *Diabetes*, vol. 58, no. 3, pp. 550–558, 2009.
- [72] G. D. Barish, V. A. Narkar, and R. M. Evans, "PPAR δ : a dagger in the heart of the metabolic syndrome," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 116, no. 3, pp. 590–597, 2006.
- [73] D. K. Krämer, L. Al-Khalili, B. Guigas, Y. Leng, P. M. Garcia-Roves, and A. Krook, "Role of AMP kinase and PPAR δ in the regulation of lipid and glucose metabolism in human skeletal muscle," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, no. 27, pp. 19313–19320, 2007.
- [74] T. Coll, D. Álvarez-Guardia, E. Barroso et al., "Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- δ by GW501516 prevents fatty acid-induced nuclear factor- κ B activation and insulin resistance in skeletal muscle cells," *Endocrinology*, vol. 151, no. 4, pp. 1560–1569, 2010.
- [75] U. Risérus, D. Sprecher, T. Johnson et al., "Activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) δ promotes reversal of multiple metabolic abnormalities, reduces oxidative stress, and increases fatty acid oxidation in moderately obese men," *Diabetes*, vol. 57, no. 2, pp. 332–339, 2008.
- [76] D. L. Sprecher, C. Massien, G. Pearce et al., "Triglyceride: high-density lipoprotein cholesterol effects in healthy

- subjects administered a peroxisome proliferator activated receptor δ agonist," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 27, no. 2, pp. 359–365, 2007.
- [77] P. M. Barger, J. M. Brandt, T. C. Leone, C. J. Weinheimer, and D. P. Kelly, "Deactivation of peroxisome proliferator-activated receptor- α during cardiac hypertrophic growth," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 105, no. 12, pp. 1723–1730, 2000.
- [78] M. F. Allard, P. G. Emanuel, J. A. Russell, S. P. Bishop, S. B. Digeress, and P. G. Anderson, "Preischemic glycogen reduction or glycolytic inhibition improves postischemic recovery of hypertrophied rat hearts," *American Journal of Physiology*, vol. 267, no. 1, pp. H66–H74, 1994.
- [79] Y. Kagaya, Y. Kanno, D. Takeyama et al., "Effects of long-term pressure overload on regional myocardial glucose and free fatty acid uptake in rats: a quantitative autoradiographic study," *Circulation*, vol. 81, no. 4, pp. 1353–1361, 1990.
- [80] T. Doenst, G. W. Goodwin, A. M. Cedars, M. Wang, S. Stepkowski, and H. Taegtmeier, "Load-induced changes in vivo alter substrate fluxes and insulin responsiveness of rat heart in vitro," *Metabolism: Clinical and Experimental*, vol. 50, no. 9, pp. 1083–1090, 2001.
- [81] A. Planavila, J. C. Laguna, and M. Vázquez-Carrera, "Nuclear factor- κ B activation leads to down-regulation of fatty acid oxidation during cardiac hypertrophy," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 17, pp. 17464–17471, 2005.
- [82] A. Planavila, J. C. Laguna, and M. Vázquez-Carrera, "Atorvastatin improves peroxisome proliferator-activated receptor signaling in cardiac hypertrophy by preventing nuclear factor- κ B activation," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1687, no. 1–3, pp. 76–83, 2005.
- [83] A. Planavila, J. C. Laguna, and M. Vázquez-Carrera, "Nuclear factor- κ B activation leads to down-regulation of fatty acid oxidation during cardiac hypertrophy," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 17, pp. 17464–17471, 2005.
- [84] S. Hirotsu, K. Otsu, K. Nishida et al., "Involvement of nuclear factor- κ B and apoptosis signal-regulating kinase 1 in G-protein-coupled receptor agonist-induced cardiomyocyte hypertrophy," *Circulation*, vol. 105, no. 4, pp. 509–515, 2002.
- [85] P. J. H. Smeets, B. E. J. Teunissen, A. Planavila et al., "Inflammatory pathways are activated during cardiomyocyte hypertrophy and attenuated by peroxisome proliferator-activated receptors PPAR α and PPAR δ ," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 43, pp. 29109–29118, 2008.
- [86] L. Cheng, G. Ding, Q. Qin et al., "Cardiomyocyte-restricted peroxisome proliferator-activated receptor- δ deletion perturbs myocardial fatty acid oxidation and leads to cardiomyopathy," *Nature Medicine*, vol. 10, no. 11, pp. 1245–1250, 2004.
- [87] G. Ding, L. Cheng, Q. Qin, S. Frontin, and Q. Yang, "PPAR δ modulates lipopolysaccharide-induced TNF α inflammation signaling in cultured cardiomyocytes," *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 40, no. 6, pp. 821–828, 2006.
- [88] P. Libby, P. M. Ridker, G. K. Hansson, and Leducq Transatlantic Network on Atherothrombosis, "Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice," *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 54, no. 23, pp. 2129–2138, 2009.
- [89] W. R. Oliver Jr., J. L. Shenk, M. R. Snaith et al., "A selective peroxisome proliferator-activated receptor δ agonist promotes reverse cholesterol transport," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 98, no. 9, pp. 5306–5311, 2001.
- [90] M. D. Leibowitz, C. Fiévet, N. Hennuyer et al., "Activation of PPAR δ alters lipid metabolism in db/db mice," *FEBS Letters*, vol. 473, no. 3, pp. 333–336, 2000.
- [91] J. N. Van Der Veen, J. K. Kruit, R. Havinga et al., "Reduced cholesterol absorption upon PPAR δ activation coincides with decreased intestinal expression of NPC1L1," *Journal of Lipid Research*, vol. 46, no. 3, pp. 526–534, 2005.
- [92] J. M. Wallace, M. Schwarz, P. Coward et al., "Effects of peroxisome proliferator-activated receptor α/δ agonists on HDL-cholesterol in vervet monkeys," *Journal of Lipid Research*, vol. 46, no. 5, pp. 1009–1016, 2005.
- [93] R. S. Rosenson, J. D. Otvos, and D. S. Freedman, "Relations of lipoprotein subclass levels and low-density lipoprotein size to progression of coronary artery disease in the pravastatin limitation of atherosclerosis in the coronary arteries (PLAC-I) trial," *American Journal of Cardiology*, vol. 90, no. 2, pp. 89–94, 2002.
- [94] T. E. Akiyama, G. Lambert, C. J. Nicol et al., "Peroxisome proliferator-activated receptor β/δ regulates very low density lipoprotein production and catabolism in mice on a Western diet," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 20, pp. 20874–20881, 2004.
- [95] T. Tanaka, J. Yamamoto, S. Iwasaki et al., "Activation of peroxisome proliferator-activated receptor δ induces fatty acid β -oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 26, pp. 15924–15929, 2003.
- [96] J. Skogsberg, K. Kannisto, T. N. Cassel, A. Hamsten, P. Eriksson, and E. Ehrenborg, "Evidence that peroxisome proliferator-activated receptor delta influences cholesterol metabolism in men," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 23, no. 4, pp. 637–643, 2003.
- [97] I. Gouni-Berthold, E. Giannakidou, M. Faust, H. K. Berthold, and W. Krone, "The peroxisome proliferator-activated receptor delta +294T/C polymorphism in relation to lipoprotein metabolism in patients with diabetes mellitus type 2 and in non-diabetic controls," *Atherosclerosis*, vol. 183, no. 2, pp. 336–341, 2005.
- [98] J. Robitaille, D. Gaudet, L. Pérusse, and M.-C. Vohl, "Features of the metabolic syndrome are modulated by an interaction between the peroxisome proliferator-activated receptor-delta -87T>C polymorphism and dietary fat in French-Canadians," *International Journal of Obesity*, vol. 31, no. 3, pp. 411–417, 2007.
- [99] N. S. Tan, L. Michalik, B. Desvergne, and W. Wahli, "Peroxisome proliferator-activated receptor- β as a target for wound healing drugs," *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, vol. 8, no. 1, pp. 39–48, 2004.
- [100] W. R. Oliver Jr., J. L. Shenk, M. R. Snaith et al., "A selective peroxisome proliferator-activated receptor δ agonist promotes reverse cholesterol transport," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 98, no. 9, pp. 5306–5311, 2001.
- [101] H. Vosper, L. Patel, T. L. Graham et al., "The peroxisome proliferator-activated receptor δ promotes lipid accumulation in human macrophages," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 47, pp. 44258–44265, 2001.
- [102] C.-H. Lee, A. Chawla, N. Urbiztondo, D. Liao, W. A. Boisvert, and R. M. Evans, "Transcriptional repression of atherogenic inflammation: modulation by PPAR δ ," *Science*, vol. 302, no. 5644, pp. 453–457, 2003.

- [103] A. C. Li, C. J. Binder, A. Gutierrez et al., “Differential inhibition of macrophage foam-cell formation and atherosclerosis in mice by PPAR α , β/δ , and γ ,” *Journal of Clinical Investigation*, vol. 114, no. 11, pp. 1564–1576, 2004.
- [104] P. Libby, “Inflammation in atherosclerosis,” *Nature*, vol. 420, no. 6917, pp. 868–874, 2002.
- [105] J. S. Welch, M. Ricote, T. E. Akiyama, F. J. Gonzalez, and C. K. Glass, “PPAR γ and PPAR δ negatively regulate specific subsets of lipopolysaccharide and IFN- γ target genes in macrophages,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 11, pp. 6712–6717, 2003.
- [106] T. L. Graham, C. Mookherjee, K. E. Suckling, C. N. A. Palmer, and L. Patel, “The PPAR δ agonist GW0742X reduces atherosclerosis in LDLR $^{-/-}$ mice,” *Atherosclerosis*, vol. 181, no. 1, pp. 29–37, 2005.
- [107] K. R. Reed, O. J. Sansom, A. J. Hayes et al., “PPAR δ status and Apc-mediated tumorigenesis in the mouse intestine,” *Oncogene*, vol. 23, no. 55, pp. 8992–8996, 2004.
- [108] F. S. Harman, C. J. Nicol, H. E. Marin, J. M. Ward, F. J. Gonzalez, and J. M. Peters, “Peroxisome proliferator-activated receptor- δ attenuates colon carcinogenesis,” *Nature Medicine*, vol. 10, no. 5, pp. 481–483, 2004.
- [109] R. A. Gupta, D. Wang, S. Katkuri, H. Wang, S. K. Dey, and R. N. DuBois, “Activation of nuclear hormone receptor peroxisome proliferator-activated receptor- δ accelerates intestinal adenoma growth,” *Nature Medicine*, vol. 10, no. 3, pp. 245–247, 2004.
- [110] B. H. Park, B. Vogelstein, and K. W. Kinzler, “Genetic disruption of PPAR δ decreases the tumorigenicity of human colon cancer cells,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 98, no. 5, pp. 2598–2603, 2001.
- [111] E. Saez, P. Tontonoz, M. C. Nelson et al., “Activators of the nuclear receptor PPAR γ enhance colon polyp formation,” *Nature Medicine*, vol. 4, no. 9, pp. 1058–1061, 1998.
- [112] A.-M. Lefebvre, I. Chen, P. Desreumaux et al., “Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor γ promotes the development of colon tumors in C57BL/6J-APC $^{Min/+}$ mice,” *Nature Medicine*, vol. 4, no. 9, pp. 1053–1057, 1998.