



Estrès del reticle endoplasmàtic, inflamació i resistència a la insulina en cèl·lules musculars esquelètiques

Laia Salvadó Serra

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

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

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



UNIVERSITAT DE BARCELONA



UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA I QUÍMICA TERAPÈUTICA

**ESTRÈS DEL RETICLE ENDOPLASMÀTIC,
INFLAMACIÓ I
RESISTÈNCIA A LA INSULINA EN CÈL·LULES
MUSCULARS ESQUELÈTIQUES**

LAIA SALVADÓ SERRA
2014



UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA I QUÍMICA TERAPÈUTICA

PROGRAMA DE DOCTORAT:
RECERCA, DESENVOLUPAMENT I CONTROL DE MEDICAMENTS

**ESTRÈS DEL RETICLE ENDOPLASMÀTIC,
INFLAMACIÓ I
RESISTÈNCIA A LA INSULINA EN CÈL·LULES
MUSCULARS ESQUELÈTIQUES**

Memòria presentada per Laia Salvadó Serra per optar al títol de doctor per la
Universitat de Barcelona

Director:

Manuel Vázquez Carrera

Doctoranda

Laia Salvadó Serra

LAIA SALVADÓ SERRA
2014

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 SAF2009-06939 (FPI BES-2010-033225) i
SAF2012-30708)

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



Tanmateix, volem agrair el suport de l'Institut de Biomedicina de la UB (IBUB)



Als meus pares

AGRAÏMENTS

Bé, s'està a punt d'acabar una etapa molt important en la meva vida en la que he viscut moments molt bons i, malgrat que n'hi ha hagut altres de difícils, tots ells m'han ajudat a créixer tant a nivell personal com a nivell professional. De fet, aquests anys de tesi m'han ajudat a veure que no es pot "tirar mai la tovallola", oblidar-se del "no sé si podré fer-ho" i donar el màxim que puguis de tu sempre, esforçar-se al màxim i les coses surten. Ara bé, la tesi també m'ha ensenyat que aquest lema és cert, però serà possible sempre que t'agradi, t'ompli i creguis en allò que fas.

Són moltes les persones que he conegut durant aquests anys a les quals els estic molt agraïda pel que m'han aportat cadascuna d'elles. Vull donar un agraïment general a tota la gent que ha estat al laboratori durant aquests anys, ja que a pesar de que no els nombri un a un, tots ells han fet que hagi sigut tan agradable el venir a treballar cada dia.

En primer lloc vull agrair al Dr. Manuel Vázquez-Carrera l'oportunitat que em va donar de fer la tesi doctoral al seu grup de recerca. Moltes gràcies pel suport, la confiança i l'ajut que m'has brindat en tot moment.

Gràcies a la Dra. Teresa Coll per ensenyar-me tan bé en els meus inicis al laboratori. Gràcies per l'ajut, suport i les bones estones que vam compartir, les quals em van ajudar a començar amb "bon peu" al laboratori.

Gràcies al Dr. Xevi Palomer per l'ajut en el treball experimental i el suport quan més ho vaig necessitar.

Gràcies a la Dra. Emma Barroso per compartir el dia a dia al laboratori, pel suport i també per ser tan bona companya de congressos! Ho trobaré a faltar!

Voldria agrair també a l'Eva tots els moments que hem compartit tant fora com dins del laboratori. Gràcies per tot l'ajut quan més ho vaig necessitar, així com també pels viatges i aquelles classes de guitarra tan productives que tant ens feien riure!

No em puc oblidar al David Álvarez, amb el que també vam compartir alguna d'aquestes classes de guitarra! Gràcies pels bons moments al laboratori, pel suport i per fer un dia a dia tan divertit al laboratori.

No em podria oblidar el “Farmaco Team”!! Moltes gràcies a tots pels entrenaments i curses compartits! Gràcies Miguel pel teu bon humor, optimisme i pel teu suport en tot moment, gràcies per ser tant bon “amfitrió” a l’hora d’organitzar els “eventos” que tant ens han unit durant aquests anys!! Gràcies també a la Luisa, al David Porquet, a la Natty, a l’Anibal, al Jose i com no, al Sergi per convertir aquells matins de diumenge amb moments inoblidables!

Vull donar les gràcies també a algunes persones que, malgrat no treballar al laboratori ja, han contribuït a que acabi aquesta etapa amb aquest bon record, gràcies a la Lucía, a l’Alba, al Pou, al Pizarro, a l’Aureli, a la Caro i a la Sarai.

I, no em puc oblidar de la resta de companys del laboratori, la Gemma, la Sònia, el Raúl, la Gaia, el Nacho... molts ànims a tots amb la tesi!

També voldria agrair a la Sílvia i a la Mar el seu ajut en el dia a dia al laboratori, així com a l’Anna Orozco pel seu ajut amb els cultius de cèl·lules musculars esquelètiques LHCN-M2.

També voldria agrair a la “Pelà” tot el suport durant aquests anys, quan ha fet falta has estat allí, gràcies. Gràcies també per compartir aquelles sessions de “running” que ens carregaven les piles per començar amb energia el dia següent, hi tornarem!

I no puc oblidar al meu estimadíssim germà! Tu em vas animar a començar amb aquesta aventura, i la veritat es que ha estat una bona aventura! Gràcies pels moments compartits, guiar-me i ajudar-me, has sigut i ets una bona referència per mi!

I com no, agrair als meus pares tot el suport i confiança que m’han brindat sempre. Gràcies per recolzar-me i ajudar-me en les meves decisions, per escoltar-me sempre que ho he necessitat i ajudar-me a escollir sempre el millor camí.

Voldria agrair també als meus gossets, el Runi i la Pu per aquells passejos de dissabte per Benissanet i per l’alegria i “bon rotllo” que donen a casa!

I finalment, no em puc oblidar del Sergi. Primer de tot donar-te les gràcies per tot el suport que m’has donat durant aquest últim tram de la tesi. Han sigut uns mesos una mica estressants, i tu has estat en cadascun dels moments que ho he necessitat, ajudant-me i fent el possible perquè jo estigués bé. Gràcies també per tots els moments compartits i per fer-me sentir tan especial. T’estimo!

Abreviatures	1
Presentació	3
Introducció	9
1. Via de senyalització de la insulina	11
1.1. Receptor de la insulina	12
1.2. IRS	12
1.3. PI3K.....	13
1.4. AKT/PKB.....	13
1.5. PKC.....	15
1.6. Transportadors de la glucosa	15
2. Resistència a la insulina.	16
2.1. Obesitat i RI.....	17
3. Àcids grassos	18
3.1. Obtenció d'AG en l'organisme.....	19
3.1.1. Transport d'AG a l'interior de la cèl·lula.....	20
3.1.2. Síntesi <i>de novo</i> d'AG	22
3.2. Utilització dels AG per part de la cèl·lula	22
3.2.1. Síntesi de lípids.....	23
3.2.2. β -Oxidació dels AG	25
3.3. Regulació transcripcional del metabolisme dels AG.....	32
4. Inflamació i resistència a la insulina	35
4.1. NF-KB.....	38
4.2. AMPK, inflamació i RI	40
4.3. MAPK, inflamació i RI	42
4.4. Efecte dels AG en les vies inflamatòries implicades en la RI.....	45
4.5. PPAR, inflamació i RI.....	50
5. Estrès del RE	52
5.1. Estrès del RE i inflamació	56
5.1.1 UPR i inflamació.....	58
5.1.2 TLR i inflamació	61
5.2. Estrès del RE i RI	63
5.3 Estrès del RE i AG.....	66
5.4 Estrès del RE, AMPK i ERK.....	68
5.5 Estrès del RE i PPAR β/δ	69

5.6 Estrès del RE com a diana terapèutica per al tractament de la DM2.....	70
Objectius	71
Resultats.....	75
PUBLICACIÓ 1: <i>Oleate prevents saturated-fatty-acid-induced ER stress, inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells through an AMPK-dependent mechanism</i>	77
PUBLICACIÓ 2: <i>PPARβ/δ prevents endoplasmic reticulum stress-associated inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells through an AMPK-dependent mechanism</i>	95
Discussió.....	127
I. L'oleat evita l'estrès del RE, la inflamació i la RI induïda per l'AG saturat palmitat en cèl·lules de múscul esquelètic mitjançant un mecanisme que involucra l'AMPK	132
II. PPAR β/δ inhibeix la inflamació i la RI en múscul esquelètic reduint l'estrès del RE mitjançant l'activació de l'AMPK.....	140
Conclusions	145
Bibliografia.....	149
Annex 1	183
PUBLICACIÓ 3: <i>Targeting PPARβ/δ for the treatment of type 2 diabetes mellitus</i>	185

ACC	<i>Acetyl-CoA carboxylase</i>
ADP	<i>Adenosine diphosphate</i>
AG	<i>Àcids grassos</i>
AGL	<i>AG lliures</i>
AMP	<i>Adenosine monophosphate</i>
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
aP2	<i>Adipocyte fatty acid-binding protein</i>
AS160	<i>AKT substrate of 160 kDa</i>
ATF4	<i>Activating transcription factor 4</i>
ATF6	<i>Activating transcription factor 6</i>
ATGL	<i>Adipose tissue triacylglycerol lipase</i>
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>
BAX	<i>BCL2-associated X protein</i>
BCL2	<i>B cell lymphoma 2</i>
BI-1	<i>BAX inhibitor-1</i>
BIP/ GRP78	<i>Immunoglobulin-heavy-chain-binding protein/78 kDa Glucose-regulated protein</i>
CAT	<i>Cicle dels àcids tricarboxilics</i>
CHOP	<i>C/EBP (CCAAT/enhancer-binding protein) homologous protein</i>
CoA	<i>Coenzyme A</i>
CPT-1	<i>Carnitine palmitoyltransferase</i>
DAG	<i>Diacilglicerol</i>
DGAT	<i>Diacylglycerol acyltransferase</i>
DM2	<i>Diabetis mellitus tipus 2</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
eIF2α	<i>Eukaryotic initiation factor 2α</i>
ERAD	<i>Endoplasmic reticulum-associated degradation</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FABPpm	<i>Fatty acid binding protein plasma membrane</i>
FAS	<i>Fatty acid synthase</i>
FAT/ CD36	<i>Fatty acid translocase/ Cluster of differentiation 36</i>
FATP	<i>Fatty acid transport proteins</i>
FOXO1	<i>Forkhead box protein O1</i>
FT	<i>Factor de transcripció</i>
GLUT4	<i>Glucose transporter 4</i>
GPAT	<i>Glycerophosphate acyltransferase</i>
GS	<i>Glycogen synthase</i>
GSK3	<i>Glycogen synthase kinase-3</i>
HSL	<i>Hormone-sensitive lipase</i>
IKKβ	<i>Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase β</i>
IL-6	<i>Interleukin 6</i>
IRE1α	<i>Inositol-requiring 1α</i>
IRS	<i>Insulin-receptor substrate</i>
IκB	<i>NF-kappa-B inhibitor</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
KDa	<i>Quilodalton</i>

1- Abreviatures

KO	<i>Knockout</i>
LKB1	<i>Liver kinase B1</i>
LPA	<i>Lysophosphatidate</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response 88</i>
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor-κB</i>
NLRP	<i>NOD (Nucleotide-binding oligomerization domain)-like receptor family pyrin domain-containing</i>
ORP150	<i>Oxygen-regulated protein 150</i>
PBA	<i>4-Phenyl butyric acid</i>
PKD1	<i>3-Phosphoinositide-dependent protein kinase 1</i>
PERK	<i>PKR-like ER kinase</i>
PGC-1α	<i>PPAR-γ coactivator-1α</i>
PGE2	<i>Prostaglandin E2</i>
PH	<i>Pleckstrin homology</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol3'-kinase</i>
PIP3	<i>Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate</i>
PKA	<i>cAMP-dependent protein kinase</i>
PKB/ AKT	<i>Protein kinase B</i>
PKC	<i>Protein kinase C</i>
PKR	<i>Double-stranded RNA (dsRNA)-dependent protein kinase</i>
PP2A	<i>Protein phosphatase-2A</i>
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PPRE	<i>PPAR response element</i>
RE	<i>Reticle endoplasmàtic</i>
RI	<i>Resistència a la insulina</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SCD1	<i>Stearoyl-CoA-desaturase1</i>
Ser	<i>Serina</i>
SERCA	<i>Sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase</i>
SIRT1	<i>Sirtuïna 1</i>
SREBP-1	<i>Sterol regulatory element binding protein 1</i>
sXBP1	<i>spliced X-box binding protein 1</i>
TG	<i>Triglicèrids</i>
Thr	<i>Treonina</i>
TIR	<i>Toll/IL-1 receptor</i>
TIRAP	<i>TIR domain containing adaptor protein</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNFα	<i>Tumor necrosis factor α</i>
TRAF2	<i>TNF receptor-associated factor 2</i>
TRAF6	<i>TNF receptor associated factor 6</i>
TRB3	<i>Tribbles-3</i>
TUDCA	<i>Taurine-ursodeoxycholic acid</i>
UPR	<i>Unfolded protein response</i>
uXBP1	<i>unspliced X-box binding protein 1</i>

2- Abreviatures

PRESENTACIÓ

La diabetis és un conjunt de malalties metabòliques caracteritzades per una hiperglucèmia resultant d'un defecte en la secreció d'insulina, en l'acció de la mateixa o ambdues. La prevalença d'aquesta patologia s'ha incrementat notablement en els darrers anys, fins al punt que es preveu que l'any 2035 el nombre de persones amb diabetis podria ser de 592 milions, motiu pel qual alguns autors la consideren una malaltia epidèmica (*International Diabetes Federation*, 2013). En termes generals la diabetis es classifica en diabetis mellitus tipus 1 (DM1) i diabetis mellitus tipus 2 (DM2), les quals ocupen un 5-10% i un 90-95%, respectivament, del total de persones que sofreixen diabetis. La causa de la DM1 és una deficiència en la secreció d'insulina atès que aquesta patologia cursa amb una destrucció autoimmune de les cèl·lules β pancreàtiques, mentre que la DM2 és el resultat de la resistència a la insulina (RI) i d'una inadequada resposta compensatòria en la secreció d'insulina (*American Diabetes Association*, 2014). Així doncs, la RI precedeix i prediu la DM2 (Grundy, 2008) i es defineix com un defecte en la capacitat de la insulina a l'hora d'inhibir la producció de glucosa per part del fetge, així com per promoure la captació de glucosa en múscul i teixit adipós (Qatanani i Lazar, 2007).

Des de fa dècades es coneix que existeix una estreta relació entre estats d'obesitat i la RI, de manera que Freidenberg i col. (1988) van demostrar que la pèrdua de pes en pacients obesos millorava la RI. Ara bé, estudis recents assenyalen que no tots els tipus d'obesitat contribueixen de la mateixa manera al desenvolupament d'aquesta patologia (Ahima i Lazar, 2013). En aquests estudis es demostra que l'excés de greix visceral o intraabdominal, a diferència del subcutani, predisposa a l'aparició de RI i DM2. D'aquesta manera, aquests autors assenyalen més a la localització del greix en l'organisme, i no tant a la seva quantitat, com a factor etiològic de la DM2. D'altra banda, Unger i Scherer (2010) van suggerir que pacients no considerats obesos també podien presentar alteracions metabòliques atès la seva incapacitat d'emmagatzemar el greix en el teixit adipós i, per tant, l'acumulació ectòpica de greix seria la responsable de l'aparició de RI. Així doncs, els mecanismes moleculars que expliquen l'estreta relació que existeix entre l'obesitat visceral, l'acumulació ectòpica de greix i el desenvolupament de RI han estat objecte d'estudi de molts investigadors (Barbarroja i col., 2010; Tchernof i Després, 2013).

Des de fa anys s'ha proposat que la inflamació podria precedir la RI (Hotamisligil i col., 1993), fins al punt que recentment Gregor i Hotamisligil (2011) assenyalen als processos inflamatoris crònics de baixa intensitat com a responsables

de l'aparició d'aquesta patologia. A més, estudis realitzats per Barbarroja i col. (2010) van demostrar que pacients obesos no resistents a l'acció de la insulina no presentaven la resposta inflamatòria que caracteritzava els pacients obesos amb RI, fet que assenyalava als processos inflamatoris presents en determinats casos d'obesitat com a responsables del desenvolupament de DM2.

Un dels processos que pot donar lloc a l'aparició d'inflamació i RI en estats d'obesitat és l'activació del que es coneix amb el nom d'estrès del RE, que s'activa quan s'altera l'homeòstasi d'aquest orgànul (Wellen i Hotamisligil, 2005; Lee i Ozcan, 2014). Per tal de restablir l'homeòstasi del RE s'activen unes vies moleculars conegudes com UPR (*Unfolded protein response*), en les quals juguen un paper clau la proteïna cinasa del RE (PERK, *PKR-like ER kinase*), la proteïna dependent d'inositol 1 (*IRE1 α* , *Inositol-requiring 1 α*) i el factor activador de la transcripció 6 (*ATF6*, *Activating transcription factor 6*). Cal destacar que aquestes tres branques de la UPR activen el procés inflamatori i promouen l'aparició de RI (Hotamisligil, 2010). Per tant, la inhibició de l'estrès del RE podria ser una bona estratègia per inhibir els processos inflamatoris que precedeixen la RI. Encara que s'ha aprofundit en l'estudi de l'estrès del RE com a responsable de l'activació de vies inflamatòries en cèl·lules β pancreàtiques, adipòcits i hepatòcits (Garg i col., 2012), aquesta relació ha estat poc estudiada en múscul esquelètic. Atès que el múscul esquelètic és el principal teixit responsable de la captació de glucosa dependent d'insulina *in vivo* (Klip i Pâquet, 1990), és important conèixer com prevenir l'activació d'aquest procés en cèl·lules musculars esquelètiques.

Un dels principals estímuls responsables de l'activació de l'estrès del RE, del procés inflamatori i de la conseqüent RI és l'increment dels nivells d'àcids grassos lliures (AGL). Ara bé, no tots els àcids grassos (AG) contribueixen de la mateixa manera activant els processos inflamatoris i, per tant, promovent l'aparició de RI i DM2. De fet, estudis recents proposen que el seguiment d'una dieta mediterrània, en la qual l'oli d'oliva és la principal font de greixos, és una bona estratègia terapèutica per a la prevenció de la DM2 (Doménech i col., 2014; Salas-Salvadó i col., 2014). El principal AG present en l'oli d'oliva és l'AG monoinsaturat oleat, el qual, tot i presentar un ampli ventall d'efectes beneficiosos, no es coneixen amb exactitud els mecanismes moleculars responsables (Bergouignan i col., 2009). En estudis previs realitzats al nostre laboratori Coll i col. (2008) van demostrar que l'oleat, a diferència del palmitat, no produïa ni inflamació ni resistència a la insulina en cèl·lules musculars

esquelètiques. Més important encara, si s'incubaven les cèl·lules amb palmitat i una concentració més petita d'oleat, l'àcid gras monoinsaturat era capaç de prevenir els efectes negatius del saturat sobre la inflamació i la RI. En aquest estudi els efectes de l'oleat es van atribuir a la capacitat d'aquest AG per incrementar l'oxidació dels AG i per reduir l'acumulació de diacilglicerol (DAG). Ara bé, quan es van utilitzar inhibidors dels processos activats per l'oleat, l'efecte d'aquest AG no es va revertir totalment, fet que suggeria que hi participaven altres mecanismes que llavors eren desconeguts. Per aquesta raó, en aquesta tesi doctoral ens vam plantejar estudiar els diferents efectes dels principals AG circulants en l'organisme humà, el palmitat i l'oleat, sobre l'estrès del RE i la seva incidència sobre el procés inflamatori i la RI en cèl·lules musculars esquelètiques.

Encara que existeixen una gran varietat de tractaments farmacològics disponibles pel tractament de la DM2, molts d'ells presenten problemes (eficàcia limitada, guany de pes, ajustaments de dosi segons funcionalitat renal, etc) que limiten la seva utilització. Aquest fet fa necessari disposar de nous fàrmacs per tractar la DM2 per a assolir els objectius del tractament farmacològic (hemoglobina glicosilada per sota del 7%). Entre els fàrmacs en estudi pel tractament de la RI i la DM2 un dels més prometedors són els agonistes de PPAR β/δ . Estudis previs realitzats al nostre laboratori van demostrar que l'activació de PPAR β/δ mitjançant GW501516 evitava la inflamació i la RI induïda pel palmitat (Coll i col., 2010). Tanmateix, ha estat descrit que l'activació de PPAR β/δ evita l'estrès del RE induït pel palmitat en cèl·lules β pancreàtiques (Cao i col., 2012). Ara bé, tot i que la capacitat de PPAR β/δ per inhibir l'estrès del RE ha estat demostrada també en fetge (Ramirez i col., 2013) i aorta (Bojic i col., 2014), no es coneixen els mecanismes moleculars responsables d'aquest procés. Per aquesta raó, també hem avaluat en aquesta tesi doctoral la capacitat dels activadors de PPAR β/δ per a evitar l'estrès del RE i la conseqüent activació de la inflamació i la RI en cèl·lules musculars esquelètiques.

En definitiva, en aquesta tesi doctoral s'ha estudiat si l'oleat i els activadors de PPAR β/δ inhibeixen l'estrès del RE i, si aquest fet podria explicar els seus efectes antiinflamatoris i antidiabètics. Els resultats obtinguts poden aportar, per una banda, una base científica per a explicar, al menys en part, perquè el consum moderat d'oli d'oliva pot ajudar a prevenir la DM2 i, per altra, pot aportar un nou mecanisme pel qual els activadors de PPAR β/δ poden contribuir a reduir la RI.

INTRODUCCIÓ

1. Via de senyalització de la insulina

La insulina és una hormona sintetitzada per les cèl·lules β pancreàtiques formada per dues cadenes polipeptídiques unides per ponts disulfur (Melloul i col., 2002). Aquesta hormona juga un paper molt important a nivell metabòlic en l'organisme, tenint com a funció principal el manteniment de la glucèmia dins uns límits molt estrets (90-110 mg/dl) (Herman i col., 2000; Mata i col., 2013). Els efectes de la insulina a nivell metabòlic per tal de mantenir l'homeòstasi glucídica en els seus principals teixits diana es detallen a continuació en la **Figura 1**.

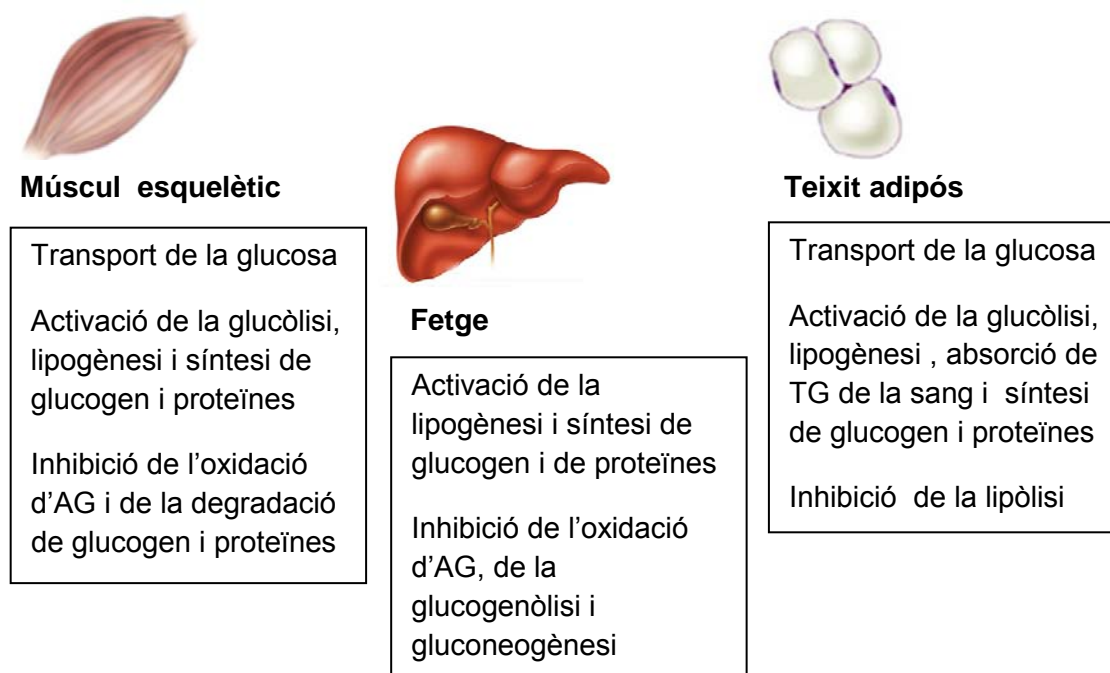


Figura 1. Resum dels principals efectes metabòlics de la insulina en l'organisme (Dimitriadis i col., 2011).

El transport de la glucosa a l'interior de la cèl·lula és un pas limitant en el metabolisme cel·lular, ja que és aquest el que permetrà que la glucosa sigui utilitzada pel teixit diana més important de la insulina, el múscul esquelètic (DeFronzo, 2004). Aquest transport es mediat pel transportador de glucosa 4 (GLUT4, *Glucose transporter 4*), localitzat principalment en vesícules en el citoplasma de cèl·lules del teixit muscular i adipós (Shepherd i Kahn, 1999). D'aquesta manera, quan s'activa la via de senyalització de la insulina la glucosa pot entrar a l'interior de la cèl·lula on serà fosforilada per l'enzim hexoquinasa i posteriorment oxidada per tal d'obtenir energia o bé emmagatzemada en forma de glucogen (Dimitriadis i col., 2011).

A continuació es descriuran les principals proteïnes implicades en la via de senyalització de la insulina (**Figura 2**).

1.1. Receptor de la insulina

El receptor de la insulina pertany a la família de receptors amb activitat tirosina cinasa (RTK, *Receptor tyrosine kinase*). Es tracta d'una glicoproteïna transmembrana amb estructura tetramèrica, que consisteix en dues subunitats α situades a nivell extracel·lular i dues subunitats β citoplasmàtiques que actuen com enzims al·lostèrics. Quan la insulina s'uneix a la subunitat α d'aquest receptor, la subunitat β s'autofosforila en residus de tirosina en posició 1146, 1150 o 1151, essent necessària la triple fosforilació per la completa activació d'aquest receptor (White i col., 1988). Quan la subunitat β és fosforilada, es produeix un canvi conformacional en el receptor que li permet fosforilar altres proteïnes en residus de tirosina, com el substrat del receptor de la insulina (IRS, *Insulin-receptor substrate*) que es detallarà a continuació (Saltiel i Kahn, 2001; Hubbard i Till, 2000).

1.2. IRS

La família de proteïnes IRS està formada per sis proteïnes (IRS1-6). Mentre que IRS4 només està present en el timus i l'hipotàlem (Dearth i col., 2007), IRS1 i IRS2 s'expressen àmpliament en l'organisme (Sun i col., 1995). A diferència dels humans, els rosegadors també expressen IRS3 en teixit adipós (M.Björnholm i col., 2002). Les diferents proteïnes IRS presenten una elevada homologia entre elles, però estudis en ratolins suggereixen efectes complementaris i no redundants d'aquestes proteïnes en la via de senyalització de la insulina. Estudis previs han demostrat que ratolins *knockout* (KO) per IRS1 (Araki i col., 1994) presenten intolerància a la glucosa que es veu alleujada per una hiperinsulinèmia, en canvi, ratolins KO per IRS2 presenten RI i diabetis (Withers i col., 1998). D'altra banda, ratolins KO per IRS3 i IRS4 no mostren alteracions a nivell metabòlic (Fantin i col., 2000).

A nivell estructural, aquestes proteïnes presenten un domini d'unió PH (*Pleckstrin homology*) i un domini PTB (*Phosphotyrosine-binding*) a l'extrem amino terminal (NH₂), a través del qual s'unirà al receptor de la insulina (White, 2002). L'extrem carboxil terminal (COOH) conté múltiples residus de tirosina i serina, de manera que quan el receptor de la insulina fosforila aquests residus de tirosina, proteïnes que contenen dominis SH2 (*Src-homology 2*), com la subunitat reguladora de fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K, *Phosphatidylinositol3'-kinase*) (p85) o la proteïna Grb2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*), s'hi uniran (Taniguchi i col., 2006), activant la via de senyalització PI3K i la via ERK (*Extracellular signal-regulated kinase*), respectivament, de la qual es parlarà en més detall més endavant (Dearth i col., 2007).

1.3. PI3K

L'enzim PI3K està format per una subunitat catalítica (p110) i una reguladora (p85). L'activació de la subunitat catalítica depèn de la interacció dels dos dominis SH2 de la subunitat reguladora amb residus de tirosina fosforilats de la proteïna IRS (Myers i col., 1992). Aquest enzim catalitza la formació de segons missatgers lipídics com el fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat (PIP3, *Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate*), que es poden unir a proteïnes amb dominis PH, com per exemple la família de proteïnes serina/treonina cinases AGC (PKA, *cAMP (cyclic Adenosine monophosphate)-dependent protein kinase*; PKG, *cGMP(cyclic Guanosine monophosphate)-dependent protein kinase*; PKC, *Protein kinase C*). La principal proteïna d'aquesta família és la proteïna cinasa dependent de fosfatidilinositol 1 (PDK1, *3-Phosphoinositide-dependent protein kinase 1*), responsable de l'activació d'altres cinases importants en la regulació de la via de senyalització de la insulina com són la proteïna cinasa B (PKB, *Protein kinase B*) o AKT i les PKCs (Taniguchi i col., 2006). Els efectes de l'activació de PI3K poden ser regulats mitjançant fosfatases, com per exemple la proteïna PTEN (*Phosphatase and tensin homologue*) o la proteïna SHIP2 (*Src homology 2-containing inositol 5'-phosphatase*), les quals desfosforilen i inactiven el PIP3. Així, estudis *in vivo* demostren que ratolins KO per *Pten* presenten una millora en la sensibilitat a la insulina (Wijesekara i col., 2005).

1.4. AKT/PKB

Existeixen tres isoformes de la proteïna AKT/PKB en mamífers (AKT1-3, també conegudes com PKB α , β i γ). Aquestes isoformes presenten una elevada homologia a nivell estructural, un domini PH d'unió a fosfolípids de la membrana plasmàtica i un domini catalític que s'activa per fosforilacions en residus de treonina i serina (Thr³⁰⁸ i Ser⁴⁷³ per AKT1, Thr³⁰⁹ i Ser⁴⁷⁴ per AKT2 i només Thr³⁰⁵ o Thr³⁰⁵ i Ser⁴⁷² per AKT3) (Taniguchi i col., 2006). La regulació de la fosforilació d'AKT/PKB la duen a terme les proteïnes PDK1 i PDK2, essent ambdues necessàries per la seva completa activació, ja que sembla ser que la proteïna PDK1 no es capaç de dur a terme la fosforilació en residus de serina i seria la proteïna PDK2 la que tindria aquest paper (Sarbasov i col., 2005). També s'ha descrit una regulació negativa d'aquesta proteïna mitjançant la fosfatasa PP2A (*Protein phosphatase-2A*) (Brazil, 2004) que desfosforila i inactiva l'AKT/PKB i la proteïna TRB3 (*Tribbles-3*) que s'hi uneix i evita la seva fosforilació i posterior activació (Du i col., 2003).

Les diferents isoformes de la proteïna AKT/PKB estan involucrades en la regulació de varis processos biològics. Així doncs, estudis previs demostren que l'absència de la proteïna AKT1 condueix a un retràs en el creixement i una reducció en

l'esperança de vida, sense produir alteracions a nivell metabòlic (Chen i col., 2001). Contràriament a la implicació fisiològica d'AKT1 en l'organisme, la deficiència en la proteïna AKT2 s'ha relacionat amb l'aparició de RI i el desenvolupament de diabetis en ratolins (Cho i col., 2001). AKT3 tampoc ha demostrat tenir un paper important en la homeòstasi de la glucosa, tot i ser una proteïna clau en el desenvolupament neural (Tschopp i col., 2005). El fet de que aquestes isoformes presentin funcions diferents es podria explicar per la diferent distribució tissular en l'organisme. Així, AKT3 s'expressa principalment en sistema nerviós i testicles, mentre que AKT1 i AKT2 estan àmpliament distribuïdes en l'organisme, tot i que cal destacar que AKT2 juga un paper molt important en múscul esquelètic (Chan i col., 1999). A més, s'ha vist que AKT2 presenta una localització cel·lular pròxima a vesícules que contenen el transportador de la glucosa GLUT4, fet que no passa amb AKT1 i AKT3 i, per tant, suggereix que aquesta isoforma juga un paper important en la regulació del metabolisme de la glucosa (Calera i col., 1998).

L'AKT/PKB s'encarrega de dur a terme les accions metabòliques de la insulina mitjançant la fosforilació de diferents substrats com la proteïna GSK3 (*Glycogen synthase kinase-3*), AS160 (*AKT substrate of 160 kDa*), *tuberin* o TSC2 (*Tuberous sclerosis complex-2*) i el factor de transcripció (FT) FOXO1 (*Forkhead box protein O1*) (Taniguchi i col., 2006). D'aquesta manera, la fosforilació de GSK3 en residus de serina (Ser⁹ en GSK3 β i Ser²¹ en GSK3 α) inactiva aquesta proteïna fent que no pugui fosforilar i, per tant, inhibir l'enzim GS (*Glycogen synthase*), permetent que tingui lloc la síntesi de glucogen (Frame i Cohen., 2001). D'altra banda, quan AKT/PKB fosforila AS160 en residus de serina i treonina (Ser³¹⁸, Ser⁵⁷⁰, Ser⁵⁸⁸, Thr⁶⁴² i Thr⁷⁵¹) vesícules que contenen el transportador de la glucosa GLUT4 migren des del citoplasma a la membrana plasmàtica permetent que la glucosa pugui entrar a la cèl·lula (Sano i col., 2003). Aquesta cinasa també és capaç de fosforilar i, com a conseqüència, inhibir TSC2 permetent que s'activi la via de senyalització regulada per mTOR donant lloc a un increment en la síntesi proteica (Harris i Lawrence, 2003). L'AKT/PKB també pot fosforilar FOXO1 en residus de Ser²⁵⁶, mantenint-lo inactiu com a FT i disminuint, per tant, la taxa de gluconeogènesi (Tran i col., 2003) i incrementant la lipogènesi (Nakae i col., 2003).

1.5. PKC

Existeixen diferents isoformes de la proteïna PKC que a nivell estructural comparteixen un domini amb activitat cinasa en l'extrem carboxil terminal unit a un domini regulador a l'extrem amino terminal on s'uneixen segons missatgers i/o efectors al·lostèrics que permeten la seva activació (Rosse i col., 2010).

La família de PKC es divideix en quatre subgrups, les PKCs convencionals (PKC α , β i γ), les PKCs noves (PKC δ , ϵ , θ i η), les PKCs atípiques (PKC ι/λ i ζ) i els membres de la subfamília PKN (PKN1, PKN2 i PKN3). Les PKCs convencionals s'activen mitjançant DAG, fosfolípids o calci, mentre que les PKCs noves només són activades per DAG i fosfolípids (Rosse i col., 2010). Les PKCs atípiques, en ser activades mitjançant PIP3 i PDK1, juguen un paper important en la translocació de vesícules que contenen el transportador de la glucosa GLUT4 a la membrana en adipòcits i cèl·lules musculars, i són de gran rellevància en la captació de glucosa en resposta a insulina (Taniguchi, 2006). Altres estudis demostren que la PKC θ és la principal isoforma en cèl·lules de múscul esquelètic i, per tant, s'ha relacionat estretament amb la regulació de la via de senyalització de la insulina (Michalczyk i col., 2013).

1.6. Transportadors de la glucosa

En mamífers, el transport de glucosa a través de la membrana cel·lular pot tenir lloc mitjançant transport actiu a través de les proteïnes de transport sodi-glucosa (SGLT, *Sodium-dependent glucose transporter*) o bé transport passiu per difusió facilitada mitjançant els transportadors GLUT, els quals tenen un paper important en la regulació de l'homeòstasi glucídica en l'organisme. Aquestes proteïnes es divideixen en tres classes en funció de les similituds a nivell estructural: Classe 1 (GLUT1-4, 14), Classe 2 (GLUT5, 7, 9 i 11) i Classe 3 (GLUT6, 8, 10, 12 i HMIT (*H⁺/myo-inositol symporter*)). GLUT1 té un paper clau en el transport de la glucosa a través de la barrera hematoencefàlica, en canvi, la translocació de les vesícules que contenen el transportador de la glucosa GLUT4 a la membrana en resposta a la insulina, és un factor limitant en la regulació de l'homeòstasi glucídica en múscul esquelètic i cardíac, així com en teixit adipós. GLUT2, en canvi, juga un paper en l'organisme com a sensor dels nivells de glucosa en les cèl·lules β dels illots de Langerhans del pàncrees, regulant així l'alliberament d'insulina (Augustin, 2010).

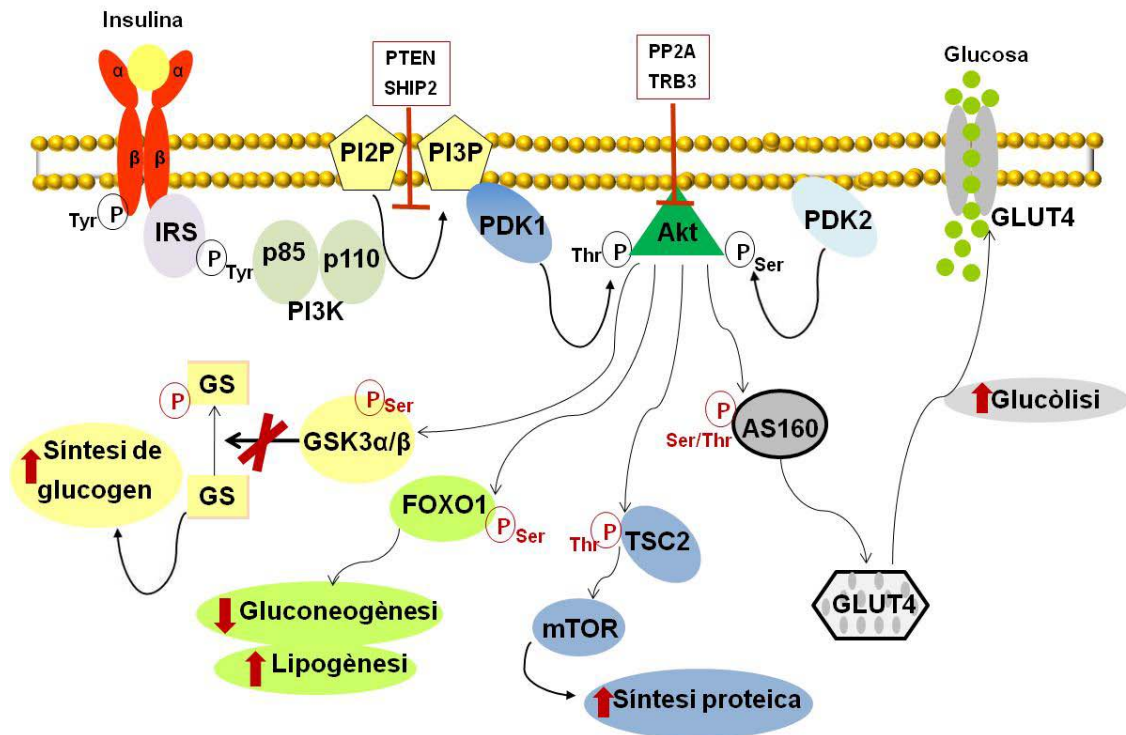


Figura 2. Via de senyalització de la insulina. Quan la insulina s'uneix al seu receptor s'activa la via de senyalització de la insulina en la que juga un paper fonamental la proteïna AKT. D'aquesta manera, la insulina pot dur a terme les seves principals funcions en l'organisme activant la glucòlisi, incrementant la síntesi de glucogen, proteïnes i lípids, així com reduint la gluconeogènesi.

2. Resistència a la insulina

Tal com s'ha vist prèviament, la insulina incrementa la captació de glucosa mitjançant la translocació dels seus transportadors des del citoplasma a la membrana plasmàtica de la cèl·lula. El múscul esquelètic és el principal teixit responsable de la captació de glucosa depenent d'insulina *in vivo*, per tant, la captació de glucosa en aquest teixit té un paper clau en el manteniment de la glucèmia (Klip i Pâquet, 1990). Així, tenint en compte la importància d'aquesta hormona en aquest teixit, la RI es podria definir com un defecte en la capacitat de la insulina per fer que la glucosa sigui utilitzada pel seu teixit diana més important, el múscul esquelètic (Saltiel i Kahn, 2001). Prèviament s'ha destacat la importància de la insulina en el metabolisme lipídic, incrementant la síntesis de lípids en fetge i teixit adipós, i atenuant l'alliberament d'AG a partir dels triglicèrids (TG). Per tant, la RI cursaria amb un defecte en la transducció de senyals que pot tenir lloc a diferents nivells (Pessin i Saltiel, 2000).

En capítols posteriors es detallarà la importància del teixit adipós visceral, la inflamació i l'estrès del reticle endoplasmàtic (RE) en la patogènesi de la RI.

2.1. Obesitat i RI

L'obesitat es defineix com un excés de grassa corporal, i en la pràctica clínica s'utilitza l'índex de massa corporal (BMI, *Body mass index*) per tal de diagnosticar aquesta patologia (Keys i col., 1972). No obstant, aquest índex no considera la presència de teixit adipós visceral o intraabdominal, entre altres limitacions, raó per la qual en estudis recents es proposa utilitzar l'índex ABSI (*Body shape index*), el qual té en compte el diàmetre de la cintura a més de l'alçada i el pes de l'individu (Krakauer, 2012). Cal destacar que l'excés de teixit adipós visceral, a diferència del subcutani, predisposa a l'aparició de la síndrome metabòlica, la qual s'associa a la presència de RI, diabetis, hiperlipèmia i malalties cardiovasculars (Unger i Scherer, 2010). De fet, estudis realitzats per Wildman i col. (2008) indiquen que existeixen individus obesos que, tot i presentar un excés de greix subcutani, són sensibles a la insulina i tenen un baix risc de sofrir malalties cardiovasculars. Així doncs, el risc de sofrir alteracions metabòliques no dependrà tant de la quantitat de greix present en l'organisme, sinó de la seva localització. Barbarroja i col. (2010) han proposat les bases moleculars per les quals l'acumulació d'aquest teixit adipós visceral induiria la presència d'un procés inflamatori que seria el responsable de la RI.

Cal destacar també que, persones que no presenten obesitat, poden sofrir alteracions metabòliques degut a que no són capaces d'emmagatzemar el greix en el teixit adipós, desenvolupant així patologies secundàries a l'acumulació ectòpica de greixos, tals com el fetge gras, RI i diabetis (Unger i Scherer, 2010). Per tant, atès que els adipòcits són les úniques cèl·lules de l'organisme amb la possibilitat d'emmagatzemar elevades quantitats d'AG en forma de TG, l'acumulació ectòpica de lípids en estats d'hiperlipèmia, pot produir lipotoxicitat i inclús la mort cel·lular (Listenberger i col., 2003). De fet, l'acumulació de lípids en múscul esquelètic s'associa estretament amb l'aparició de RI (Shulman, 2000). Aquests estudis també apunten als processos inflamatoris crònics de baixa intensitat, resultants de l'acumulació ectòpica de greix, com a responsables de l'aparició d'alteracions metabòliques (Wellen i Hotamisligil, 2005).

Així doncs, la incapacitat d'emmagatzemar de manera correcta els lípids procedents de la dieta o bé la hipertròfia i elevada taxa lipolítica del teixit adipós visceral, poden ser els responsables de l'augment dels AGL en l'organisme, que al seu torn poden conduir a l'aparició de RI (Boden i col., 1991; Boden i Chen, 1995; Roden i col., 1996; Boden, 1997).

S'han proposat diferents possibilitats per tal d'explicar com l'excés de teixit adipós visceral es relaciona tan estretament amb complicacions metabòliques. El teixit adipós, especialment el teixit adipós intraabdominal, es caracteritza per ser

hiperlipolític i resistent a l'efecte antilipolític de la insulina. A més, és capaç de secretar citocines, les quals, tal com es detallarà més endavant, poden donar lloc a processos inflamatoris crònics de baixa intensitat i alterar el metabolisme glucídic i lipídic (Tchernof i Després, 2013). Tanmateix, l'alliberació d'AGL procedents del teixit adipós de persones obesas, pot donar lloc a estrès del RE. El RE es un orgànu present en totes les cèl·lules eucariòtiques i que té un important paper en la síntesi i plegament de proteïnes. Alteracions en l'homeòstasi d'aquest orgànu condueix al que es coneix com estrès del RE, el qual ha estat objecte de molts estudis, atès que s'ha relacionat estretament amb l'aparició d'alteracions metabòliques, tals com la RI i, en última instància, la DM2 (Lee i Ozcan, 2014).

3. Àcids grassos

Els AG de la dieta es classifiquen d'acord a uns paràmetres que tenen importància biològica, com la longitud de la cadena de carboni i el nombre de dobles enllaços. Els AG saturats representen un 30-40% del total d'AG presents en l'organisme, destacant l'àcid palmític (16:0) i l'àcid esteàric (18:0) com els més abundants (Rioux i Legrand, 2007). Els AG saturats s'han relacionat amb l'aparició d'alteracions metabòliques, essent l'àcid palmític el més abundant en la dieta i, per tant, el principal causant d'aquestes alteracions. Encara que la majoria d'AG saturats s'han relacionat amb un increment dels nivells de colesterolèmia, aquests efectes no s'han observat en el cas de l'àcid esteàric, degut a que aquest és altament afí per l'enzim SCD1 (*Stearoyl-CoA-desaturase1*) que introdueix insaturacions als AG saturats. Els AG insaturats es classifiquen en funció del número de dobles enllaços com a mono i poliinsaturats i es troben principalment en la configuració *cis*. Tenint en compte la posició del primer doble enllaç en la cadena de carbonis des de l'extrem metil terminal, es classifiquen en AG de la sèrie omega-3 (ω -3), omega-6 (ω -6) i omega-9 (ω -9). L'àcid oleic (C18:1), membre de la sèrie ω -9, és un dels AG més abundants en la natura, essent l'oli d'oliva una de les principals fonts en la dieta (Lottenberg i col., 2012). Així doncs, cal destacar que l'AG saturat palmitat i l'insaturat oleat són els més abundants en la dieta els quals representen un 27 i un 31%, respectivament, del total d'AGL que es troben al plasma (Staiger i col., 2004) (**Figura 3**).

S'ha observat que poblacions de l'àrea mediterrània amb un elevat consum d'àcid oleic, tenen una baixa prevalença d'obesitat, DM2, malalties cardiovasculars i síndrome metabòlica (Pérez-Martínez i col., 2011; Gillingham i col., 2011; Kastorini i col., 2011). De fet, Salas-Salvadó i col. (2014) han destacat recentment la importància de l'oli d'oliva en la prevenció de la DM2 a l'hora de reduir el risc de desenvolupar

aquesta patologia en un grup de persones alimentades amb dieta mediterrània enriquida amb oli d'oliva, respecte altres persones alimentades amb una dieta control amb baix contingut de greixos.

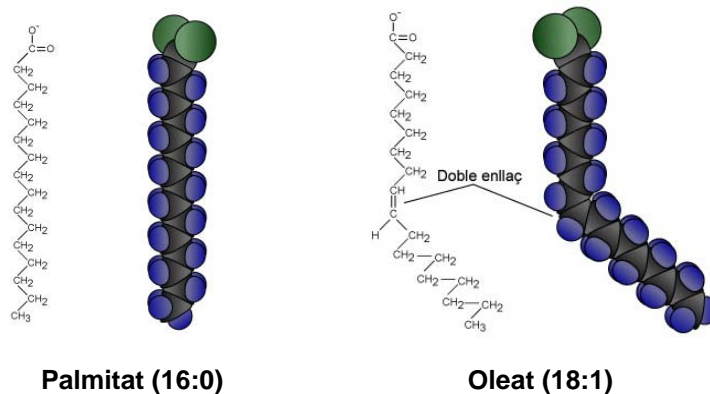


Figura 3: Estructura de l'AG saturat palmitat i el monoinsaturat oleat.

3.1. Obtenció d'AG en l'organisme

La ingesta lipídica, generalment en forma de TG, representa d'un 30 a un 40% del total energètic de la dieta. Els TG ingerits amb els àpats poden ser hidrolitzats mitjançant lipases linguals i pancreàtiques, de manera que els monoglicèrids i AG resultants d'aquesta hidròlisi són captats pels enteròcits i reconvertits a TG que s'incorporaran als quilomicrons per ser secretats a circulació sanguínia. D'altra banda, el fetge secreta VLDL (*Very-low-density lipoproteins*) formades a partir d'AG sintetitzats *de novo* o procedents del plasma, esterificats formant TG. Així, els quilomicrons que transporten TG exògens i les VLDL que transporten TG endògens, són hidrolitzats per les LPL (*Lipoprotein lipases*) situades a la superfície dels capil·lars sanguinis, les quals faciliten l'alliberació d'AG a teixits perifèrics. Cal destacar també que els TG emmagatzemats en els adipòcits, són hidrolitzats per les lipases HSL (*Hormone-sensitive lipase*) i ATGL (*Adipose tissue triacylglycerol lipase*), de manera que els AG resultants de la hidròlisi poden ser distribuïts a la resta de teixits transportats per l'albumina a través de la circulació sanguínia (Glatz i col., 2010). Estudis previs demostren que l'acumulació de productes resultants de la hidròlisi dels TG com el DAG, són capaços d'inhibir la via de senyalització de la insulina en múscul esquelètic (Timmers i col., 2008; Coll i col., 2008).

3.1.1. Transport d'AG a l'interior de la cèl·lula

La captació d'AG a través de la membrana plasmàtica té lloc mitjançant mecanismes de difusió o *flip-flop*, regulats pels nivells d'AG extracel·lulars així com pel grau de metabolisme lipídic en la cèl·lula. El mecanisme de *flip-flop* és un procés limitant en el transport d'AG a través de la bicapa lipídica ja que pot no ser suficientment ràpid com per cobrir la demanda metabòlica en teixits com el múscul esquelètic, i caldrà que proteïnes de membrana realitzin aquest paper (Kampf i col., 2006). Una vegada en el citoplasma, els AG són transportats mitjançant la proteïna d'unió d'AG (FABPc, *Fatty acid-binding protein cytoplasmic*) (Glatz i col., 2001). D'altra banda, també s'ha observat que els AG poden actuar mitjançant l'activació dels TLR (*Toll-like receptor*). Shi i col. (2006) van demostrar la importància de l'activació d'aquests receptors per part dels AG de la dieta pel que fa a processos inflamatoris i alteracions de la via de senyalització de la insulina. Estudis recents demostren que els AG no s'uneixen directament als TLR-4, sinó que la fetuina A actua com a lligand endogen d'aquests (Pal i col., 2012).

Seguidament es descriuran les principals proteïnes de membrana encarregades de transportar els AG a l'interior cel·lular.

FABPpm (*Fatty acid binding protein plasma membrane*)

La FABPpm, també coneguda com mAspAT (*Aspartate aminotransferase mitochondrial*) actua com a proteïna transportadora d'AG a través de la membrana plasmàtica (Isola i col., 1995) i mitocondrial (Teller i col., 1990), respectivament. Diferents estudis evidencien que aquesta proteïna s'expressa més en cor que en múscul esquelètic, fet que s'associa amb la diferent taxa de metabolisme lipídic d'aquests teixits (cor>múscul) (Luiken i col., 1999). Clarke i col. (2004) van demostrar que en sobreexpressar FABPpm en múscul esquelètic de rata, es veia incrementat el transport d'AG a través del sarcolema, així com el metabolisme dels mateixos, fet que destacava la importància d'aquesta proteïna en mamífers.

CD36 (*Cluster of differentiation 36*)

La proteïna CD36, també coneguda com translocasa d'AG (FAT, *Fatty acid translocase*), pertany a la família de receptors *scavenger* de classe B, i en presentar múltiples llocs de glucosilació en la seva estructura, s'inclou dins la família de glicoproteïnes de classe IV. El fet de pertànyer a la família de receptors *scavenger*, vincula la proteïna CD36 amb funcions sobre la immunitat innata, tot i que posteriorment es va veure que presentava funcions importants sobre el transport d'AG i l'angiogènesi. Aquesta proteïna s'expressa en l'endoteli microvascular, en cèl·lules

musculars llises, adipòcits, múscul esquelètic, cèl·lules dendrítiques, epitelis de la retina, mama i intestí, així com en cèl·lules hematopoètiques (Febbraio i col., 2001). Estudis realitzats per Nickerson i col. (2009) van confirmar el paper de CD36, tant en el transport d'AG com en l'oxidació dels mateixos. Cal destacar que aquesta proteïna pot jugar un paper indirecte en la captació i utilització de la glucosa degut a que és un potent mediador del metabolisme energètic, així doncs, Aitman i col. (1999) van demostrar que models de rata SHR (*Spontaneously hypertensive rat*) deficientes en CD36 presentaven RI. Per tant, de la mateixa manera que la insulina en unir-se al seu receptor és capaç d'activar una cascada de senyalització que involucra la proteïna PI3K, que al seu torn permetrà que GLUT4 transloqui a la membrana per tal de que la glucosa pugui entrar a la cèl·lula per ser metabolitzada, la insulina també és capaç d'induir la translocació d'alguns transportadors d'AG. En aquest sentit, Luiken i col. (2002) van observar que la inhibició farmacològica de la proteïna PI3K inhibia la captació d'AG per part de la cèl·lula, així com la translocació de CD36 en múscul esquelètic.

FATP (*Fatty acid transport proteins*)

S'han descrit fins a sis isoformes de la proteïna transportadora d'AG FATP (FATP1-6), que s'expressen de manera específica en els diferents teixits de l'organisme (Doege i Stahl, 2006). FATP1 és la principal isoforma en teixit adipós, malgrat que també s'expressa en múscul esquelètic i en menor grau en cor. Ha estat descrit que la manca d'aquesta proteïna en adipòcits i múscul esquelètic impedeix la captació d'AG per part de la cèl·lula en resposta a insulina, mentre que la captació d'AG basal no es veu afectada, fet que destaca l'important paper d'aquesta proteïna en resposta a insulina (Wu i col., 2006). La isoforma FATP2 s'expressa principalment en fetge i en ronyó, i la FATP3 en fetge, testicles, pulmó i pell (Glatz i col., 2010). La FATP4 és l'única proteïna de la família FATP que s'expressa en la part apical dels enteròcits madurs de l'intestí prim i està implicada en l'absorció dels greixos de la dieta (Stahl i col., 1999). FATP5 s'expressa només en fetge (Hirsch i col., 1998) i FATP6 principalment en cor (Gimeno i col., 2003). Experiments realitzats per Gimeno i col. (2003) van demostrar que el transport d'AG mitjançant les FATPs depèn del tipus d'AG transportat i, de fet, el palmitat va mostrar més afinitat per la isoforma FATP6, mentre que l'oleat era més afí per la FATP4.

3.1.2. Síntesi de novo d'AG

La lipogènesi està regulada tant a nivell nutricional com hormonal, així doncs, dietes riques en carbohidrats l'incrementen, mentre que el dejuni o dietes riques en greixos l'inhibeixen. Els dos principals teixits encarregats de la síntesi d'AG en l'organisme són el fetge i el teixit adipós. Els AG sintetitzats al fetge són exportats mitjançant lipoproteïnes i tenen finalitat, tant energètica, com estructural formant part de les membranes de la cèl·lula, mentre que al teixit adipós la síntesi d'AG té com a finalitat l'emmagatzematge d'energia a llarg termini (Nguyen i col., 2008). La lipogènesi té lloc en el citoplasma cel·lular a partir d'una molècula d'acetil-CoA, i l'etapa limitant d'aquest procés està regulada per l'acetil-CoA carboxilasa (ACC, *Acetyl-CoA carboxilase*) (**Figura 4**), enzim "donador" de grups acetil que converteix l'acetil-CoA en malonil-CoA (Kim, 1997). L'enzim que catalitza la reacció inversa a l'ACC és el malonil-CoA decarboxilasa (MCD, *Malonyl-CoA decarboxylase*), que catalitza la degradació del malonil-CoA. S'ha associat una disminució en la taxa d'oxidació dels AG amb un augment de la concentració de malonil-CoA i, per tant, una disminució de l'activitat MCD (Nakamura i col., 2014). Una vegada format el malonil-CoA, l'AG sintasa (FAS, *Fatty acid synthase*) s'encarrega de la síntesi d'AG en l'organisme, fet que el situa principalment en els dos principals teixits de síntesi d'AG en l'organisme, el fetge i el teixit adipós. Aquest enzim es troba regulat tant a nivell hormonal pels nivells d'insulina, com per l'estat nutricional de l'individu (Sul i col., 2000), així doncs, mentre que la insulina l'activa, s'ha vist que nivells elevats d'AG en l'organisme l'inhibeixen (Nguyen i col., 2008).

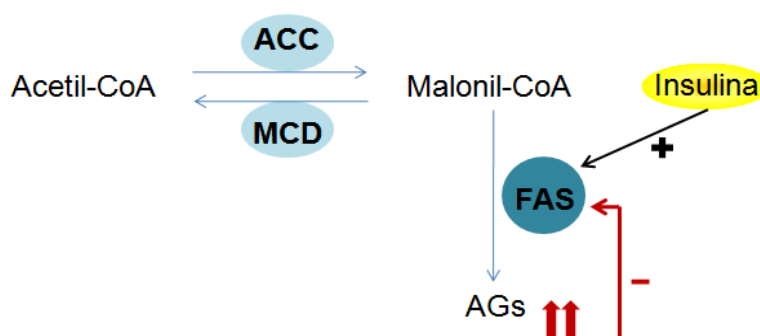


Figura 4. Esquema de la síntesi de novo d'AG. Regulació positiva (insulina) i negativa (nivells elevats d'AG) de la via.

3.2. Utilització dels AG per part de la cèl·lula

Els AG procedents de la dieta o bé sintetitzats de novo, són substrat de l'acil-CoA sintetasa (ACS, *Acyl-CoA synthetase*) (**Figura 5**) que catalitza la síntesi d'acil-CoA a partir dels AG. Els AG activats en forma d'acil-CoA poden ser oxidats per

obtenir energia, poden ser utilitzats per la cèl·lula per la síntesi de TG i fosfolípids, actuar com a intermediaris en vies de senyalització cel·lulars o bé actuar com a lligands de FT (Coleman i col., 2002). Faergeman i Knudsen (1997) van destacar la importància dels acil-CoA com a molècules de senyalització cel·lular, ja que són capaços d'alterar la secreció d'insulina, així com el transport i metabolisme de la glucosa.

3.2.1. Síntesi de lípids

Una vegada activats els AG en forma d' acil-CoA, aquests són transferits mitjançant l'enzim glicerofosfat aciltransferasa (GPAT, *Glycerophosphate acyltransferase*) a una molècula de glicerol-3-fosfat provinent de la glicòlisi, de la fosforilació del glicerol durant la lipòlisi o bé a partir del piruvat mitjançant la gliceroneogènesi, donant lloc a l'àcid lisofosfatídic (LPA, *Lysophosphatidate*) o 1-acil-glicerol-3-fosfat (Reshef i col., 2003). El LPA és transportat al RE on es troben la majoria d'enzims necessaris per dur a terme la síntesi de TG (Coleman i Lee, 2004). A continuació, l'àcid fosfatídic aciltransferasa (LPAAT, *Lysophosphatidate acyltransferase*) és capaç de convertir el LPA en àcid fosfatídic (PA, *Phosphatidate*) (Bursten i col., 1991), el qual serà convertit a DAG mitjançant la fosfatasa de l'àcid fosfatídic (PAP, *Phosphatidic acid phosphatase*) (Jamal i col., 1991) o bé a glicerofosfolípids formant part de les membranes cel·lulars (Gimeno i Cao, 2008) (**Figura 5**).

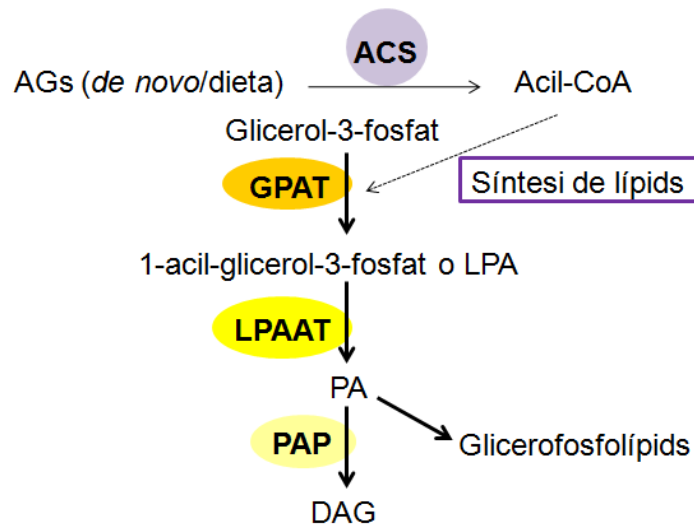


Figura 5. Esquema de la formació de DAG a partir dels AG sintetitzats *de novo* o procedents de la dieta.

Diacilglicerol i triglicèrids

Per tant, tal com s'ha vist prèviament el DAG pot sintetitzar-se a partir d'AGL o bé formar-se mitjançant la hidròlisi dels TG que dona lloc a monoglicèrids i AGL, que seran convertits a DAG mitjançant l'enzim monoacilglicerol aciltransferasa (MGAT, *Monoacylglycerol acyltransferase*) als enteròcits (Lee i col., 2001). Una altra font de formació de DAG requereix la hidròlisi del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat (PI(4,5)P₂, *Phosphatidylinositol-4,5-phosphate*) mitjançant la fosfolipasa C (PLC, *Phospholipase C*) present en la membrana plasmàtica. El DAG pot actuar com a segon missatger a nivell intracel·lular, així com a intermediari en la síntesi de TG (Coen i Goodpaster, 2012) mitjançant l'enzim diacilglicerol aciltransferasa (DGAT, *Diacylglycerol acyltransferase*) (Coleman i Lee, 2004). Estudis previs destaquen la importància d'aquest enzim en la síntesi de TG en veure que ratolins amb alteracions en el gen *Dgat2* presentaven una severa reducció en el contingut de TG (Stone i col., 2004). Listenberger i col. (2003) van demostrar que fibroblasts embrionaris murins deficientes en el gen *Dgat1* no podien acumular TG en resposta a palmitat i oleat, fet que els conduïa a la mort cel·lular. Aquest fet semblava indicar que la síntesi de TG té un paper protector front la lipotoxicitat cel·lular, i que tant els AG saturats com els AG monoinsaturats són tòxics quan s'impedeix la síntesi de TG. Ara bé, aquests autors van observar que no tots els AG són capaços d'acumular-se en forma de TG de la mateixa manera; mentre que en cèl·lules CHO (*Chinese hamster ovary*) l'oleat s'acumulava en forma de TG i era ben tolerat per la cèl·lula, el palmitat no tan sols no formava TG sinó que induïa apoptosi. Estudis posteriors amb cèl·lules de múscul esquelètic murines van confirmar que el palmitat, atès que reduïa els nivells d'expressió gènica de *Dgat2*, s'acumulava principalment en forma de DAG. En canvi l'oleat, en no modificar-ne l'expressió, era capaç d'acumular-se en forma de TG i inclús evitava la reducció dels nivells d'expressió gènica de *Dgat2* i de formació de TG ocasionada pel palmitat (Coll i col., 2008). Aquests i altres estudis (Montell i col., 2001; Yu i col., 2002) demostren que l'acumulació dels AG en forma de DAG condueix a l'aparició de RI, fet que destaca el paper d'aquest intermediari lipídic en la lipotoxicitat cel·lular. Tal com s'ha comentat prèviament, el DAG és capaç d'actuar com a segon missatger, de manera que pot regular negativament la via de senyalització de la insulina mitjançant l'activació de la PKC, essent les isoformes noves les principals implicades en la RI induïda per lípids. Aquestes cinases, mitjançant la fosforilació de la proteïna IRS en residus de serina, eviten l'activació del complex PI3K i la conseqüent translocació de les vesícules que contenen GLUT4 a la membrana cel·lular de manera que la glucosa no pot entrar a la cèl·lula per ser metabolitzada (Timmers i col., 2008). De fet, s'han identificat fins a tres estereoisòmers de la molècula de DAG (1,3-DAG,

2,3-DAG i 1,2-DAG) que poden induir RI en múscul, essent la isoforma 1,2-DAG la única capaç d'interferir en la via de senyalització de la insulina activant la PKC (Turinsky i col., 1990; Boni i Rando., 1985).

Ceramides

Les ceramides s'inclouen dins la família dels esfingolípidis, i malgrat que se'ls han atribuït importants funcions com a components estructurals de les membranes cel·lulars, alguns autors descriuen la importància d'aquests lípids a l'hora d'actuar com a segons missatgers a nivell intracel·lular. Schmitz-Peiffer i col. (1999), van demostrar que l'addició de palmitat a cultius cel·lulars de miotubs contribuïa a l'acumulació de ceramides, confirmant la importància del palmitat com a precursor en la seva síntesi. Pickersgill i col. (2007) van observar que en múscul esquelètic, encara que el palmitat s'acumulava en forma de DAG i ceramides, aquestes darreres eren les responsables de la RI induïda per l'AG saturat, i que l'oleat tenia un paper protector facilitant l'acumulació del palmitat en forma de TG. Estudis realitzats per Chavez i col. (2003) confirmen els resultats anteriors demostrant que, malgrat que el palmitat en múscul esquelètic s'acumula en forma de DAG i ceramides, aquestes darreres serien les responsables de la inhibició de la via de senyalització de la insulina. Aquests autors destaquen el paper de la fosfatasa PP2A a l'hora d'inhibir la via de senyalització de la insulina per part de les ceramides en miotubs C2C12. Malgrat la implicació d'aquests lípids en la RI induïda pel palmitat, tal com s'ha comentat anteriorment en estudis en humans el DAG ha demostrat tenir un paper clau en la RI induïda per AG saturats en múscul esquelètic (Montell i col., 2001).

3.2.2. β -Oxidació dels AG

Atès que la membrana mitocondrial interna no és permeable als acil-CoAs, l'entrada d'AG de cadena llarga a la mitocòndria està regulada per l'activitat de l'enzim carnitina palmitoiltransferasa (CPT-1, *Carnitine palmitoyltransferase I*) (**Figura 6**). Aquest enzim es localitza a la membrana mitocondrial externa i és capaç de convertir els acil-CoAs en acilcarnitina, la qual travessarà la membrana mitocondrial interna mitjançant la carnitina-acilcarnitina translocasa (CACT, *Carnitine acylcarnitine traslocase*), i finalment l'enzim CPT-2, ja a la matriu mitocondrial, convertirà l'acilcarnitina en el respectiu acil-CoA (Kerner i Hoppel, 2000). L'oxidació mitocondrial dels acil-CoA per tal d'obtenir energia té lloc mitjançant la β -oxidació que resulta en la formació d'acetil-CoA que pot ser oxidat completament a CO₂ al cicle dels àcids tricarboxílics (CAT) (Nguyen i col., 2008). En cas que la mitocòndria no pugui oxidar de manera adequada els AG, es poden acumular intermediaris com els acil-CoA, que s'ha

demostrat que poden alterar la via de senyalització de la insulina (Shulman, 2000). Malgrat que no es coneixen els mecanismes mitjançant els quals els acil-CoA poden donar lloc a aquesta RI, s'ha proposat l'acumulació en forma de DAG o bé ceramides com a possibles causants d'aquesta patologia (Coen i Goodpaster, 2012).

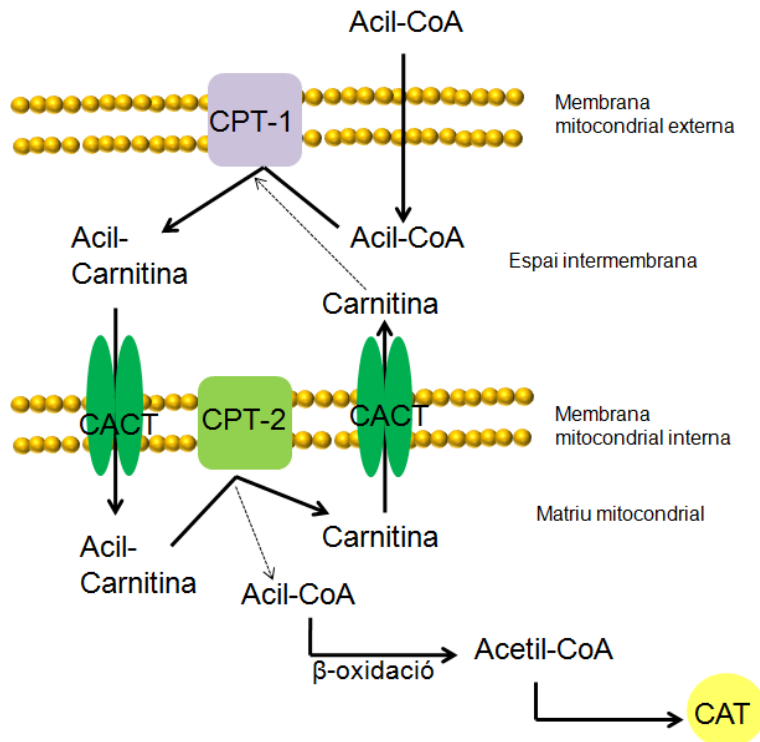


Figura 6. Esquema de l'entrada dels acil-CoAs a la mitocondria. Quan els acil-CoAs travessen la membrana mitocondrial externa, aquests són convertits a acil-carnitina mitjançant l'enzim CPT-1, el qual permet la seva entrada a la mitocondria. Una vegada dins la matriu mitocondrial, l'acil-carnitina dona lloc al l'acil-CoA per acció de l'enzim CPT2. Aquest acil-CoA una vegada dins a la mitocondria podrà ser oxidat per obtenir energia.

AMPK (*AMP-activated protein kinase*)

L'AMPK és una serina/treonina cinasa activada per AMP (*Adenosine monophosphate*), implicada en la regulació de l'homeòstasi energètica, i formada per una subunitat α catalítica i dues subunitats reguladores β i γ . S'han descrit varies isoformes de cadascuna de les subunitats que conformen aquesta proteïna que presenten diferent distribució tissular; així doncs, s'han descobert dues isoformes de les subunitats α ($\alpha 1$ i $\alpha 2$) i β ($\beta 1$ i $\beta 2$) i fins a tres isoformes de la subunitat γ ($\gamma 1-3$) (Salminen i col., 2011). Mentre que la isoforma $\alpha 2$ s'expressa principalment en múscul esquelètic, cardíac i en fetge, la isoforma $\alpha 1$ presenta una expressió ubíqua (Mu i col., 2001). La subunitat α catalítica conté dominis Ser/Thr cinasa altament conservats prop de la regió N-terminal dins el bucle d'activació. La fosforilació de residus de Thr¹⁷² dins d'aquest bucle és crítica per la seva activitat enzimàtica (Hawley i col., 1996). La

subunitat β conté un domini d'unió a glicogen (GBD, *Glycogen-binding domain*), el qual facilita la col·locació de l'AMPK amb l'enzim GS, permetent el control de la síntesi de glucogen per part d'aquesta proteïna (Bendayan i col., 2009; Polekhina i col., 2003). Finalment, la subunitat γ té com a principal funció la de regular la subunitat catalítica actuant com a sensor dels nivells intracel·lulars d'ATP (*Adenosine triphosphate*), ADP (*Adenosine diphosphate*) i AMP. Inicialment es pensava que l'activació de l'AMPK tenia lloc només per unió d'aquesta cinasa a l'AMP; no obstant, estudis recents suggereixen que tant la unió de l'AMP com de l'ADP podrien donar lloc a canvis conformacionals els qual activarien l'AMPK mitjançant dos mecanismes: a) promovent la fosforilació en residus de Thr¹⁷² per part de cinases o b) antagonitzant la seva desfosforilació per part de fosfatases (Davies i col., 1995; Sanders i col., 2007). Les cinases responsables de la fosforilació i conseqüent activació de l'AMPK són la proteïna cinasa supressora de tumors (LKB1, *Liver kinase B1*) i la proteïna cinasa dependent de calci i calmodulina (CaMKK β , *Ca²⁺/Calmodulin-dependent kinase β*). Així com la CaMKK β s'activa en resposta a un augment en la concentració de Ca²⁺ citosòlic, LKB requereix la unió a les proteïnes MO25 (*Mouse protein 25*) i STRAD (*Ste20-related adaptor*), formant així un complex proteic que li confereix activitat cinasa (Srivastava i col., 2012). Cal destacar que la sirtuïna 1 (SIRT1) juga una paper important a l'hora d'activar l'AMPK. Així doncs, Hou i col. (2008) van demostrar que la sobreexpressió de *SIRT1* en hepatòcits incrementava la fosforilació d'LKB1, AMPK i ACC, suggerint un important paper de SIRT1 en la regulació de l'AMPK, inhibint processos de lipogènesi i gluconeogènesi en l'organisme. En general, l'AMPK té un paper inhibitori sobre processos que consumeixen ATP, mentre que és capaç d'activar vies catabòliques en l'organisme per tal d'obtenir energia (Hardie i Pan, 2002). Així mateix, aquesta cinasa regula un ampli ventall d'enzims encarregats de mantenir l'homeòstasi energètica de l'organisme (**Taula 1/Figura 7**).

Proteïna regulada per l'AMPK	Efecte sobre el metabolisme glucídic
AS160	↑ Entrada de glucosa a la cèl·lula
PFK2 (<i>Phosphofructokinase</i>)	↑ Glucòlisi
GS	↓ Síntesi de glucogen
FOXO (<i>G6P (Glucose-6-phosphatase)</i>), PEPCK (<i>Phosphoenolpyruvate carboxykinase</i>)	↓ Gluconeogènesi
PGC-1 α (<i>PPAR-γ coactivator-1α</i>)	↑ Biogènesi mitocondrial
Proteïna regulada per l'AMPK	Efecte sobre el metabolisme lipídic
FAT/CD36	↑ Entrada d'AG a la cèl·lula
HSL i ATGL	↑ Lipòlisi
ACC-1, SREBP-1 (<i>Sterol regulatory element binding protein 1</i>) i HNF-4 α (<i>Hepatic nuclear factor-4α</i>) (<i>PK (Pyruvate kinase)</i>), ACC-1 i FAS)	↓ Síntesi d'AG
HMGR (<i>3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase</i>)	↓ Síntesi d'esterols
GPAT	↓ Síntesi de TG i PL
ACC-2	↑ Oxidació d'AG
PGC-1 α	↑ Biogènesi mitocondrial
Proteïna regulada per l'AMPK	Efecte sobre el metabolisme proteic
mTOR	↓ Síntesi de proteïnes

Taula 1. Resum dels principals efectes de l'AMPK per tal de mantenir l'homeòstasi energètica en l'organisme (Srivastava i col., 2012). El color vermell i el color blau indiquen una regulació negativa i positiva d'aquestes proteïnes per part de l'AMPK, respectivament.

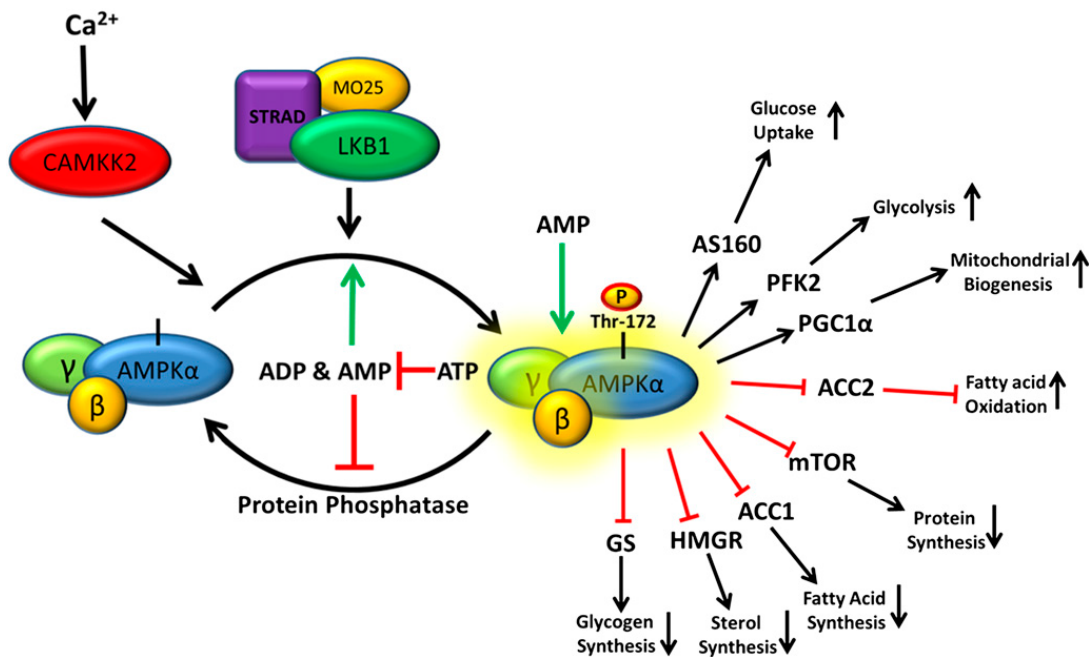


Figura 7. Estructura, regulació i paper de l'AMPK en l'organisme. El dèficit energètic en l'organisme es tradueix en un increment en la relació ADP:ATP i AMP:ATP, que en última instància afavoreix la fosforilació de l'AMPK depenent d'LKB1, alhora que es veu reduïda la seva desfosforilació. Una vegada activada, l'AMPK és capaç de fosforilar i regular un ampli ventall de proteïnes per tal de mantenir l'homeòstasi energètica en l'organisme (Srivastava i col., 2012).

Estudis realitzats per Gauthier i col. (2011) i Martínez Agustin i col. (2010) van demostrar que l'AMPK s'expressa menys i és menys activa en el teixit adipós visceral que en el subcutani, fet que podria explicar en gran part les alteracions metabòliques presents en els pacients amb obesitat visceral. No obstant, el teixit adipós visceral presenta una elevada taxa lipolítica, que podria ser deguda a la baixa sensibilitat d'aquest teixit a l'acció de la insulina (Tchernof i Després, 2013). Així doncs, en casos d'obesitat visceral, l'elevada taxa lipolítica pot superar la capacitat oxidativa de l'organisme, donant lloc a un augment d'AGL en plasma, els quals competeixen amb la glucosa per tal de ser metabolitzats. D'aquesta manera, l'entrada d'AG a la cèl·lula i posterior oxidació, condueix a l'acumulació d'acetil-CoA i citrat, els quals en última instància inhibeixen l'entrada de glucosa a la cèl·lula generant RI (Randle i col., 1963; Kelley i col., 1993). Estudis més recents defensen el "model lipotòxic" de la RI en múscul esquelètic, el qual recolza la idea de que l'excés de lipòlisi afavoreix l'acumulació d'AG en forma de DAG i ceramides, responsables juntament amb l'acil-CoA de l'aparició de RI (Shulman, 2000; Itani i col., 2002). Aquests autors destaquen el paper de la PKCθ i posterior fosforilació de la proteïna IRS-1 en residus de serina/treonina a l'hora d'inhibir la via de senyalització de la insulina. Així com els AG

una vegada dins la cèl·lula poden inhibir la captació de glucosa pels mecanismes esmentats prèviament, aquests també són capaços d'incrementar la seva pròpia oxidació activant la cinasa AMPK i conduint a una inactivació de l'enzim ACC, el qual ja s'ha vist prèviament que és el responsable de la formació de malonil-CoA (Clark i col., 2004). Tenint en compte que l'enzim CPT-1, que permet l'entrada dels acil-CoAs a la mitocòndria, es troba inhibït pel malonil-CoA, la inactivació de l'enzim ACC per part dels AG, conduirà a un increment de l'activitat CPT-1, permetent així l'entrada d'AG a la mitocòndria a fi de ser metabolitzats (Watt i col., 2006). S'han descrit dues isoformes de l'enzim ACC. L'ACC-1 s'expressa en teixit adipós blanc i marró, fetge i glàndula mamària, mentre que l'ACC-2 s'expressa en fetge i, en menor proporció, en cor, múscul esquelètic i teixit adipós blanc. Cal destacar que els nivells d'ACC-2 augmenten durant la diferenciació en cor i múscul esquelètic, alhora que es redueix l'expressió d'ACC-1. Donada l'elevada taxa de lipogènesi que té lloc en el fetge, els nivells intracel·lulars d'ACC-1/2 es veuen reduïts durant el dejuni, mentre que es recuperen rere la ingesta (Brownsey i col., 2006). Tanmateix, tant el múscul esquelètic com el cardíac no expressen l'enzim lipogènic FAS, ja que en aquests teixits no té lloc la síntesi d'AG *de novo*, suggerint que el malonil-CoA produït per l'ACC-2 pot tenir un important paper regulador de l'oxidació dels AG. El fet que l'ACC-2 estigui implicada en la regulació de l'oxidació dels AG en múscul esquelètic i no en la síntesi dels mateixos podria explicar la seva localització intracel·lular. Així, mentre que l'ACC-1 se situa en el citoplasma, l'ACC-2 es troba associada a la mitocòndria prop de CPT-1 (Abu-Elheiga i col., 2000). L'ACC-1 pot ser fosforilada per l'AMPK en 3 posicions (Ser⁷⁹, Ser¹²⁰⁰ i Ser¹²¹⁵), essent la fosforilació en Ser⁷⁹ present també en la isoforma ACC-2, responsable de la inhibició d'aquesta proteïna per part de l'AMPK (Davies i col., 1990; Abu-Elheiga i col., 1997; Ha i col., 1994). A més, s'ha vist que la insulina és capaç d'activar l'ACC-1 mitjançant cinases dependents d'insulina, així mateix, l'activació de l'ACC per part d'aquesta hormona no té lloc si s'inhibeix la via de senyalització que involucra PI3K (Brownsey i col., 2006).

Estudis realitzats per Chen i col. (2000) van demostrar que humans que havien practicat exercici presentaven un augment en la fosforilació de l'ACC-2 per part de l'AMPK en múscul esquelètic. Per tant, aquests estudis confirmen el paper clau d'aquesta proteïna a l'hora d'estimular l'oxidació dels AG mitjançant la fosforilació de l'ACC-2 en condicions en què la cèl·lula requereix energia. S'ha observat que l'ACC-1 pot ser fosforilada per altres cinases diferents de l'AMPK com la PKA (*cAMP-dependent protein kinase*), tot i ser la primera la més rellevant a nivell fisiològic. La PKA fosforila ACC-1 en residus de Ser⁷⁷ i Ser¹²⁰⁰, causant la inactivació d'aquest enzim (Hardie i Pan., 2002). A més, Coll i col. (2008) van destacar el paper d'aquesta

cinasa en el metabolisme oxidatiu en demostrar que l'oleat incrementava els nivells d'expressió gènica de *Cpt-1* mitjançant un mecanisme que involucrava la PKA.

Finalment, cal destacar que Watt i col. (2006) van confirmar el paper clau de l'AMPK a l'hora d'induir l'oxidació dels AG i reduir l'esterificació i emmagatzematge intramiocel·lular dels mateixos. Tal com s'ha comentat prèviament, alguns autors demostren que el dèficit energètic cel·lular pot ser el responsable de l'activació al·lostèrica d'aquesta cinasa mitjançant la unió de l'AMP a l'AMPK, evitant la desfosforilació dels residus de Thr¹⁷² per part de la proteïna fosfatasa 2C (PP2C, *Protein phosphatase 2C*) (Kemp i col., 2003). Malgrat la importància de l'AMP a l'hora d'activar la cinasa AMPK, altres estudis indiquen que els AG poden activar aquesta proteïna facilitant-ne la fosforilació per part d'LKB1, independentment de la carga energètica de l'organisme. Així, Watt i col. (2006) van demostrar que els AG poden modular al·lostèricament l'AMPK, convertint-la en un substrat millor per la cinasa LKB1. No obstant, aquests efectes són de curta durada per tal de que tingui lloc la β -oxidació i aquests es puguin metabolitzar per tal d'obtenir energia.

Per tant, atès que l'AMPK està implicada en un ampli rang d'activitats biològiques en l'organisme, aquesta proteïna s'ha proposat com una atractiva diana terapèutica per al tractament de la síndrome metabòlica, regulant així alteracions a nivell del metabolisme lipídic i glucídic. De fet, fàrmacs utilitzats en la pràctica clínica exerceixen els seus efectes antidiabètics mitjançant l'activació d'aquesta cinasa. És el cas de la metformina, que activa l'AMPK ja que és capaç de reduir la càrrega energètica en l'organisme (Brunmair i col., 2004), alhora que s'ha vist que aquest fàrmac requereix de la presència d'LKB1 en fetge per tal de poder reduir la glucèmia (Shaw i col., 2005). Altres fàrmacs utilitzats en la pràctica clínica són les glitazones, com la pioglitazona, que a banda d'afavorir la fosforilació i posterior activació de l'AMPK degut a l'increment del ràtio AMP:ATP (LeBrasseur i col., 2006), poden actuar com a lligands dels receptors activats per proliferadors peroxisòmics γ (PPAR γ , *Peroxisome proliferator-activated receptor γ*), dels quals es parlarà més endavant (Spiegelman, 1998). A més, existeixen activadors directes de l'AMPK (AICAR, A-769662), així com inhibidors de la mateixa (Compost C) no utilitzats en la pràctica clínica, però que són eines claus per a la investigació de les vies que involucren l'AMPK. Així com l'AICAR i l'A-769662 són capaços d'activar al·lostèricament l'AMPK (Corton i col., 1995; Sanders i col., 2007), el Compost C la inhibeix actuant com a competidor reversible de l'ATP (Zhou i col., 2001).

Finalment, cal destacar que, malgrat que l'AMPK juga un paper clau sobre el metabolisme oxidatiu en l'organisme, també se li han atribuït importants funcions sobre

l'estrès del RE, processos inflamatoris i, en última instància sobre la RI, dels quals es parlarà en més detall en capítols posteriors.

3.3. Regulació transcripcional del metabolisme dels AG

Els AGL poden regular el metabolisme energètic actuant com a lligands dels PPAR, receptors nuclears que actuen com a FT (Nakamura i col., 2014). Són tres les isoformes que formen la família dels PPAR, PPAR α (NR1C1, *Nuclear Receptor 1C*), PPAR β/δ (NR1C2; NUC1 (*Nuclear hormone receptor 1*); FAAR, *Fatty acid-activated receptor*) i PPAR γ (NR1C3). Tant PPAR α com PPAR γ estan presents en un gran nombre d'espècies, no obstant, PPAR β/δ va ser identificat inicialment com PPAR β en *Xenopus laevis* i NUC1 en humans. Posteriorment aquest receptor va ser identificat en ratolí amb el nom de PPAR δ atès que no era totalment homòleg al PPAR β aïllat inicialment en *Xenopus*, no obstant, actualment se'ls coneix amb el nom de PPAR β/δ . Les funcions fisiològiques dels PPAR resulten de la seva activitat com a FT, modulant l'expressió de gens específics relacionats amb el metabolisme lipídic, l'homeòstasi glucídica, la diferenciació cel·lular, així com la regulació de processos inflamatoris i la resposta immune. La implicació dels PPAR en aquestes funcions depèn de la seva distribució tissular i unió a lligands (**Taula 2**), així com del reclutament de coactivadors o corepressors (Desvergne i Wahli, 1999; Moraes i col., 2006). Cal destacar la importància del coactivador PGC-1 en la regulació de l'homeòstasi lipídica a llarg termini. Tant la isoforma PGC-1 α com PGC-1 β s'expressen en múscul esquelètic, atès que ambdues isoformes estan presents en teixits amb una elevada capacitat oxidativa. Així, els principals efectes biològics d'aquests coactivadors consisteixen en regular els mecanismes cel·lulars per tal d'incrementar la seva capacitat de produir energia (St-Pierre i col., 2003). Estudis realitzats pel nostre grup van demostrar que models animals de DM2 com la rata ZDF (*Zucker diabetic fatty*), presentaven nivells reduïts d'mRNA (*Ribonucleic acid*) de *Pgc-1 α* i *Pgc-1 β* (Jové i col., 2004). A més, en estudis posteriors van observar que el palmitat, a diferència de l'oleat, reduïa l'expressió de *Pgc-1 α* en cèl·lules C2C12 (Coll i col., 2006), fet que es podria relacionar amb les alteracions metabòliques produïdes per aquest AG.

	Distribució tissular	Funció	Lligands
PPAR α	Fetge Múscul esquelètic Teixit adipós Cor	- Metabolisme lipídic, principalment regulant processos de β -oxidació - Inflamació	- Sintètics Agonistes: Fibrats, WY14643, GW7647 Antagonistes: MK886, GW6471 - Naturals: Activadors: Àcid docosahexaenoic, àcid araquidònic, àcid linoleic, eicosanoids Inhibidors: 2Br-C16 (2-bromopalmitat)
PPAR β/δ	Expressió ubiqua	- Metabolisme lipídic - Inflamació - Proliferació cel·lular	- Sintètics Agonistes: GW501516, GW0742, L165041 Antagonistes: GSK0660, GSK3787 - Naturals: Activadors: Àcid docosahexaenoic, àcid araquidònic, àcid linoleic, eicosanoids Inhibidors: 2Br-C16
PPAR γ	Teixit adipós Cèl·lules del sistema immunitari Intestí	- Diferenciació adipocitària - Homeòstasi glucídica i lipídica - Inflamació	- Sintètics Agonistes: Tiazolidindiones, GW1929 Antagonistes: GW9662 - Naturals: Activadors: Àcid docosahexaenoic, àcid araquidònic, eicosanoids

Taula 2. Distribució tissular, funció i lligands dels PPAR.

A nivell estructural aquests FT presenten quatre dominis: AF1 (*Activation function 1*) o domini A/B de localització N-terminal, DBD (*DNA (Deoxyribonucleic acid) binding domain*), la regió frontissa (*Hinge region*) i el LBD (*Ligand binding domain*) o AF2 el qual se situa a la regió C-terminal dels PPAR (Moraes i col., 2006) (**Figura 8A**). Els PPAR heterodimeritzen amb el receptor RXR (*9-cis Retinoic acid receptor*) que al seu torn està unit a l'àcid 9-cis retinoic, de manera que aquest complex proteic pot reconèixer els elements de resposta a PPAR (PPRE, *PPAR response element*), situats a la regió promotora dels seus gens diana (Isseman i col., 1993). Els PPRE consisteixen en una seqüència repetitiva "AGGTCA" separada per un nucleòtid, de manera que també es coneixen amb el nom de DR-1 (*Direct repeated sequence*) separada per un sol nucleòtid (Ijpenberg i col., 1997). Aquests FT es troben inactius units a proteïnes corepressores, i serà la unió a lligands la que promourà la dissociació d'aquests repressors i la posterior unió de proteïnes coactivadores que incrementarà la transcripció dels seus gens diana, mecanisme conegut com transactivació (Zhu i col., 1997) (**Figura 8B**). A més, s'ha observat que els PPAR poden regular l'expressió de gens de manera independent a la unió dels PPRE mitjançant mecanismes de transrepressió en els quals els complexes PPAR-RXR regulen negativament l'activitat d'altres FT com per exemple AP-1 (*Activator protein 1*), NF- κ B (*Nuclear factor- κ B*), NFAT (*Nuclear factor of activated T cells*) i STAT (*Signal transducers and activators of transcription*) fet que explica en gran part els efectes antiinflamatoris dels PPAR (Daynes y Jones., 2002) (**Figura 8C**).

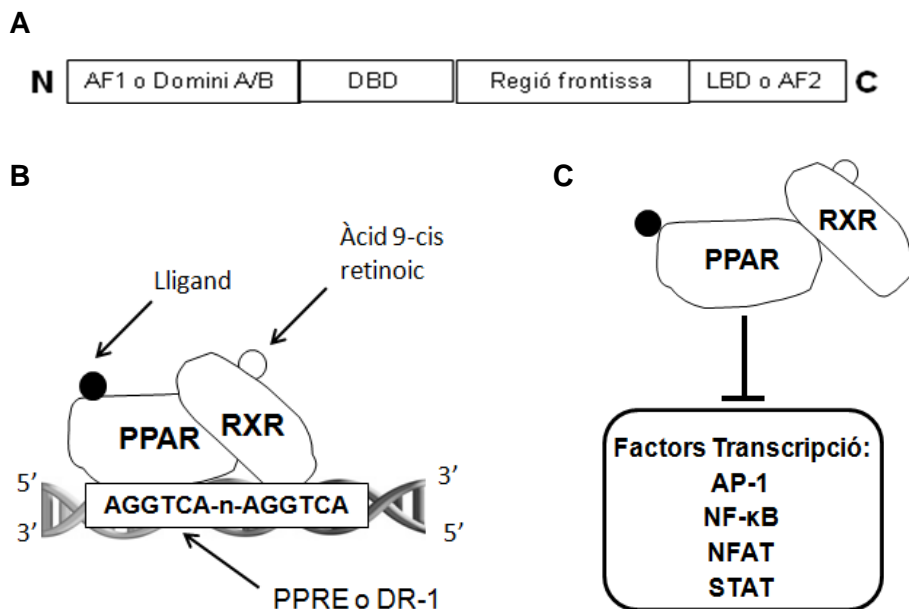


Figura 8. Estructura i activació transcripcional dels PPAR. (A) Esquema de l'estructura de la família de receptors nuclears PPAR. (B) Mecanisme molecular de transactivació dels PPAR. (C) Mecanisme molecular de transrepressió dels PPAR.

4. Inflamació i resistència a la insulina

Tal com s'ha vist en capítols anteriors, la insulina juga un paper important a l'hora d'assegurar el correcte emmagatzematge energètic en l'organisme (**Figura 2**). A més, s'ha parlat de l'obesitat i la sobrenutrició com agents etiològics en l'aparició de la RI (Unger i Scherer, 2010; Saltiel, 2012). Així, Saltiel (2012) en un dels seus estudis es va qüestionar quins podien ser els mecanismes moleculars responsables d'aquest procés. Aquest autor va proposar que quan les reserves energètiques del fetge, teixit adipós i múscul són elevades, com passa en estats d'obesitat i sobrenutrició, la insulina exerceix un mecanisme de *feedback* negatiu sobre la seva pròpia via de senyalització. D'aquesta manera, activa les proteïnes ERK, mTORC1 (*Mammalian target of rapamycin complex 1*) i la cinasa S6, que al seu torn fosforilaran IRS en residus de serina conduint en última instància a RI i, per tant, a una reducció de la lipogènesi i glucogènesi. Així doncs, Saltiel (2012) defineix la RI com una resposta homeostàtica de l'organisme front a situacions d'estrès en les quals es requereix mobilitzar energia enlloc d'emmagatzemar-la, la qual es considerarà un estat patològic quan aquesta sigui sostinguda i sistèmica.

Estudis recents demostren que estats d'obesitat i sobrenutrició s'acompanyen d'un procés inflamatori de baixa intensitat (Gregor i Hotamisligil, 2011). Aleshores, Saltiel (2012) va proposar que els processos inflamatoris podrien ser un vincle d'unió entre l'obesitat i la RI, els quals podrien activar vies catabòliques a través de l'alliberament de citocines, i actuar com a defensa front l'excés d'emmagatzematge de nutrients present en estats d'obesitat i sobrenutrició. Per exemple, el factor de necrosi tumoral α (TNF α , *Tumor necrosis factor α*), citocina amb important activitat proinflamatòria, és capaç d'activar vies catabòliques (Torti i col., 1985) i incrementar la lipòlisi en adipòcits a través de la via de les cinases activades per mitogens (MAPK, *Mitogen-activated protein kinases*) (Souza i col., 2003). Cal destacar el paper de la proteïna c-Jun NH2-terminal (JNK, *c-Jun N-terminal kinase*), membre de la família de les MAPK, a l'hora d'induir RI. S'han descrit fins a tres isoformes de la proteïna JNK (JNK1-3), essent la isoforma JNK1 la que es relaciona més estretament amb l'aparició de RI (Jaeschke i col., 2004). Wellen i Hotamisligil (2005) proposen que en resposta a estímuls com l'estrès del RE, citocines i AG, la cinasa JNK és capaç de fosforilar IRS1 en residus de serina conduint a l'aparició de RI. Hirosumi i col. (2002) van destacar el paper d'aquesta proteïna en la via de senyalització de la insulina, ja que la seva activitat estava incrementada en fetge, múscul i teixit adipós de ratolins que presentaven obesitat i, a més, la falta de JNK1 en aquests ratolins evitava l'aparició de RI. Així doncs, posteriors estudis van suggerir que la inhibició de la cinasa JNK podria ser una bona estratègia terapèutica pel tractament de la diabetis (Kaneto i col., 2004).

Cal destacar també que aquesta cinasa està implicada en processos inflamatoris, donada la seva habilitat per regular l'activitat del FT AP-1 (Davis, 2000) i, per tant, està involucrada en l'activació de vies inflamatòries que conduiran a l'aparició de RI (Solinas i Karin, 2010). En capítols posteriors es parlarà amb més profunditat de la via de les MAPK, així com de l'estrès del RE, les quals han estat objecte d'estudi en aquesta tesi doctoral. A més, es detallarà el paper dels AG en les vies inflamatòries implicades en la RI.

Així doncs, diferents mecanismes poden ser els responsables de l'activació del procés inflamatori que precedeix la RI en estats d'obesitat. Nombrosos investigadors s'han centrat en l'estudi d'aquest procés a fi d'esbrinar perquè aquesta resposta inflamatòria no és capaç de resoldre's, alhora que la RI resultant no pot frenar el continu emmagatzematge energètic. D'entrada, estudis realitzats per Gregor i Hotamisligil (2011) van referir-se a la inflamació present en estats d'obesitat com a meta-inflamació, atès que aquesta no presentava els signes d'un procés inflamatori clàssic. Així doncs, van definir la meta-inflamació com una inflamació crònica de baixa intensitat present en estats d'obesitat. A més, aquests autors es van adonar que existien mecanismes de *feedback* negatiu que frenaven aquesta resposta inflamatòria, responsables de mantenir aquest baix grau d'inflamació present en estats d'obesitat. Cal destacar que citocines proinflamatòries com la interleucina 6 (IL-6, *Interleukin 6*) poden participar en aquest procés de regulació negativa, induint l'expressió de citocines antiinflamatòries com la IL-10 (Allen i Febbraio, 2010).

D'aquesta manera, considerant l'important paper de la inflamació a l'hora d'induir RI, Knobler i col. (2003) es van qüestionar si processos inflamatoris crònics no induïts per estats d'obesitat, també podrien donar lloc a RI. Aquests investigadors van demostrar que pacients amb altres patologies inflamatòries com la infecció crònica pel virus de l'hepatitis C, desenvolupaven DM2 per un mecanisme que involucrava $TNF\alpha$. A més, aquest vincle entre la inflamació i la RI es va recolzar per un estudi en el qual elevades dosis de salicilats van millorar la RI en pacients que presentaven DM2, mitjançant la inhibició de la proteïna inhibidora $\kappa B-\beta$ ($IKK\beta$, *Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase β*) (Hundal i col., 2002) de la qual es parlarà en més detall en capítols posteriors.

Cal destacar que el primer indicador de la presència d'inflamació en el teixit adipós de ratolins obesos va ser la presència de nivells elevats de la citocina proinflamatòria $TNF\alpha$ (Hotamisligil i col., 1993), la qual també va aparèixer elevada en el teixit adipós de pacients obesos (Hotamisligil i col., 1995). Estudis posteriors van demostrar que un ampli ventall de citocines participaven en el procés inflamatori

present en estats d'obesitat, tals com la IL-6, la IL-1 β i la proteïna quimioattractant de monòcits (MCP1, *Monocyte chemoattractant protein 1*) (Shoelson i col., 2006; Berg i col., 2005). Malgrat que l'alliberació d'aquestes citocines té lloc principalment en el teixit adipós degut a l'elevat nombre de macròfags proinflamatoris o M1 infiltrats (Olefsky i Glass, 2010), és ben conegut que aquest procés també pot tenir lloc en el fetge (Cai i col., 2005), pàncrees (Ehnes i col., 2007), cervell (De Souza i col., 2005) i múscul (Saghizadeh i col., 1996).

Encara que l'alliberació de citocines proinflamatòries tals com la IL-6 s'ha relacionat estretament amb el procés inflamatori desencadenant de la RI en fetge i múscul (Franckhauser i col., 2008; Klover i col., 2003; Kim i col., 2004), estudis posteriors van demostrar que durant la pràctica d'exercici físic el múscul esquelètic augmentava l'alliberament d'IL-6, alhora que la insulina presentava major activitat després de la realització d'aquest exercici (Wojtaszewski i Richter, 2006). A més, estudis realitzats per Carey i col. (2006) van demostrar que la IL-6 era capaç d'incrementar la translocació de GLUT4 a la membrana i la conseqüent captació de glucosa per part de la cèl·lula, alhora que aquesta citocina activava l'AMPK i, com a conseqüència, incrementava l'oxidació de greixos en múscul i teixit adipós (Allen i Febbraio., 2010). Aquest fet s'ha relacionat amb la capacitat de la IL-6 per activar la leptina, hormona amb activitat catabòlica a la qual se li han atribuït efectes antidiabètics (Saltiel, 2012). Per tant, aquests estudis apunten que els increments aguts d'IL-6, tals com els observats per la realització d'exercici (Steensberg i col., 2001) afavoririen la sensibilitat a la insulina (Carey i Febbraio., 2004), mentre que l'elevació crònica dels nivells d'aquesta citocina seria la responsable dels efectes negatius en l'organisme.

Així doncs, tenint en compte la importància de les citocines proinflamatòries en estats d'obesitat, nombrosos investigadors s'han dedicat a l'estudi dels mecanismes que conduïen a l'alliberament d'aquestes citocines, demostrant que, a més de la cinasa JNK, les proteïnes IKK i PKR (*Double-stranded RNA (dsRNA)-dependent protein kinase*) podrien jugar un paper clau en aquest procés (Solinas i Karin, 2010; Nakamura i col., 2010). La PKR és una proteïna d'expressió ubiqua en l'organisme i amb activitat serina i treonina cinasa, responsable de l'activació de l'inflamasoma (Lu i col., 2012a). Hotamisligil (2010) defineix l'inflamasoma com un complex proteic que regula l'activació de vies involucrades en l'estrès del RE, la inflamació i la sensibilitat a la insulina en resposta a nutrients i patògens. Així doncs, l'activació de la proteïna clau de l'inflamasoma, la PKR, té lloc per autofosforilació a partir d'estímuls com les citocines proinflamatòries, infeccions virals o bacterianes o per dany en el DNA. Una vegada activada pot interaccionar amb les proteïnes que conformen l'inflamasoma, tals

com l'NLRP1 (*NOD (Nucleotide-binding oligomerization domain)-like receptor family pyrin domain-containing 1*), NLRP3, NLRC4 (*NOD-like receptor family CARD (Caspase activation and recruitment domain)-containing protein 4*) i AIM2 (*Absent in melanoma 2*). Així doncs, la proteïna PKR pot conduir a l'activació de les cinases MAPK i IKK i, en última instància, a activar FT proinflamatoris tals com AP-1 i NF- κ B, respectivament (Kang i Tang, 2012). Per tant, cal destacar que alguns autors proposen les proteïnes encarregades de regular l'inflamasoma com a possible diana terapèutica per al tractament de patologies com l'obesitat i la diabetis (Strowig i col., 2012),

Tal com s'ha comentat prèviament, en resposta a estímuls inflamatoris s'activen vies moleculars que condueixen a la fosforilació de la proteïna IRS1 en residus de serina, conduint en última instància a RI (Gregor i Hotamisligil, 2011). Aquests autors proposen que l'activació de vies inflamatòries juga un paper clau a l'hora de reduir la sensibilitat a la insulina tant en teixit adipós com en fetge, i suggereixen que els mediadors inflamatoris generats en aquests teixits seran els responsables de la inflamació que precedeix la RI en múscul en casos d'obesitat (Cai i col., 2005; Yang i col., 2005). Ara bé, Itani i col. (2002) van destacar també la importància del múscul esquelètic a l'hora de donar lloc a processos inflamatoris relacionats amb l'aparició de RI. Així, aquests autors van demostrar que la infusió de lípids en pacients sans conduïa a un increment en els nivells de DAG i de l'activitat de la PKC, donant lloc finalment a l'activació de vies inflamatòries. A més, estudis previs havien demostrat que el teixit muscular de pacients obesos era capaç d'alliberar citocines proinflamatòries tals com el TNF α , fet que es relacionava estretament amb la reducció de la sensibilitat a la insulina en aquests pacients (Saghizadeh i col., 1996). Recentment, altres estudis recolzen aquesta idea en demostrar que el palmitat activava vies inflamatòries en miotubs C2C12, incrementant així els nivells d'expressió gènica de les citocines proinflamatòries *Tnf α* i *Il-6* (Jové i col., 2006; Coll i col., 2008).

4.1. NF- κ B

Tal com s'ha detallat en capítols anteriors, diverses situacions d'estrès en l'organisme poden donar lloc a processos inflamatoris en els quals hi juga un paper molt important la cinasa IKK, així com la conseqüent activació del FT NF- κ B.

La família del FT NF- κ B presenta importants funcions a l'hora de regular la resposta inflamatòria en l'organisme, però cal destacar que aquest també està implicat en processos de proliferació i apoptosi cel·lular. En mamífers, aquesta família està formada per cinc membres: RelA (p65), RelB, c-Rel, p50/p105 (NF- κ B1) i p52/p100 (NF- κ B2), els quals es combinen entre ells formant homodímers o heterodímers. Cal

destacar que RelA (p65), RelB i c-Rel contenen un domini de transactivació localitzat a l'extrem C-terminal. A més, aquestes proteïnes es caracteritzen per presentar un domini altament conservat conegut com RHD (*Rel-homology domain*) localitzat a l'extrem N-terminal, responsable de la dimerització, interacció amb la proteïna inhibidora κ B ($I\kappa$ B, *NF-kappa-B inhibitor*), i unió al DNA. La família $I\kappa$ B està formada principalment per tres proteïnes, $I\kappa$ B α , $I\kappa$ B β i $I\kappa$ B ϵ , responsables de mantenir el complex NF- κ B: $I\kappa$ B inactiu, evitant la translocació d'NF- κ B al nucli. Quan NF- κ B està inactiu, es troba majoritàriament en forma d'heterodímer format per les subunitats p50/p65 i unit principalment a la proteïna $I\kappa$ B α (Hayden i Ghosh, 2004). En resposta a estímuls proinflamatoris, les proteïnes del complex IKK fosforilen $I\kappa$ B α en residus de Ser³² i Ser³⁶, els quals permeten que aquesta proteïna sigui ubiquitinitzada i degradada al proteosoma (Figura 9).

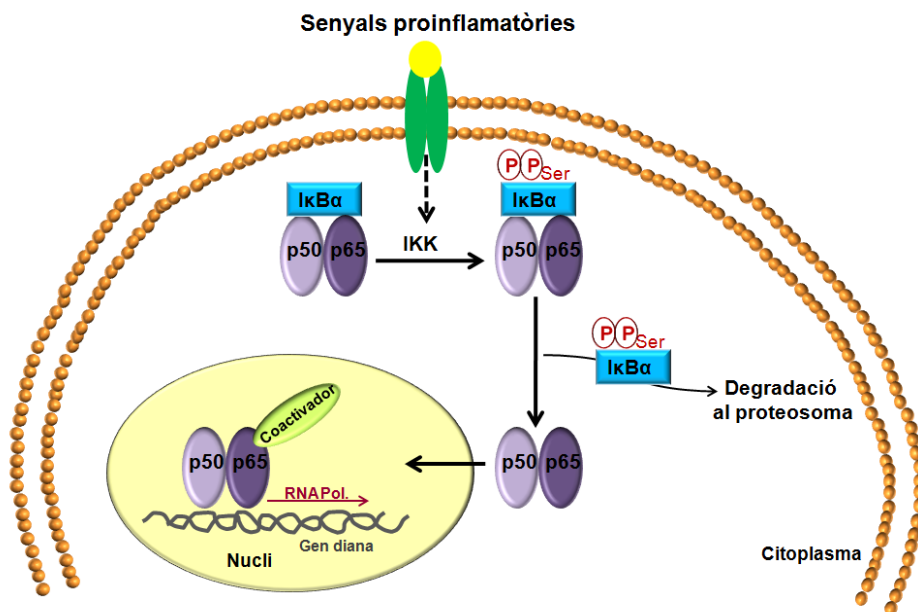


Figura 9. Activació del FT NF- κ B en resposta a estímuls proinflamatoris. La cinasa IKK en ser activada en resposta a senyals proinflamatoris, fosforila la proteïna inhibidora d'NF- κ B ($I\kappa$ B α), permetent que les subunitats p50 i p65 d'aquest FT puguin translocar al nucli i incrementar la transcripció dels seus gens diana.

Cal destacar que en molts models cel·lulars, les proteïnes $I\kappa$ B β i $I\kappa$ B ϵ també poden ser fosforilades i degradades, però amb una cinètica més lenta (Perkins, 2007). Atès que $I\kappa$ B α és ràpidament degradada després de la seva fosforilació, NF- κ B s'encarrega de regular la seva transcripció permetent restablir els nivells d'aquesta proteïna (Arenzana-Seisdedos i col., 1995). Estudis amb ratolins deficientes en $I\kappa$ B α van demostrar que existeixen altres mecanismes que participen en la regulació de la

unió de p50/p65 al DNA (Beg i col., 1995; Klement i col., 1996). Així, Chen i col. (2002) van observar que tant l'acetilació en residus de Lys221 com en Lys310 incrementava l'activitat transcripcional d'NF- κ B (Chen i col., 2002).

El complex proteic IKK, que juga un paper clau en la regulació de la proteïna inhibidora d'NF- κ B I κ B α , està format per dues subunitats catalítiques (IKK α i β) així com una subunitat reguladora (IKK γ) (Häcker i Karin, 2006). Cal destacar que la proteïna IKK β pot regular negativament la via de senyalització de la insulina a través de dos mecanismes, mitjançant la fosforilació de la proteïna IRS1 en residu de Ser³⁰⁷, així com també pot fosforilar la proteïna inhibidora d'NF- κ B, permetent l'activació d'aquest FT i, en última instància, incrementar la transcripció de citocines proinflamatòries tals com la *IL-6* i *TNF α* (Shoelson i col., 2003).

4.2. AMPK, inflamació i RI

Estudis recents destaquen el paper de l'AMPK a l'hora d'inhibir l'activitat del FT NF- κ B, reduint així estats d'inflamació crònica de baixa intensitat (Yang i col., 2010b; Gauthier i col., 2011) els quals, tal com s'ha comentat prèviament, presenten un paper molt important a l'hora d'afavorir el desenvolupament de RI. Així doncs, estudis realitzats per Cacicedo i col. (2004) van confirmar el paper antiinflamatori de l'AMPK en demostrar que aquesta cinasa va ser capaç d'inhibir la transactivació del FT NF- κ B causada per TNF- α i l'AG saturat palmitat en cèl·lules endotelials. Salminen i col. (2011) van proposar que l'AMPK inhibeix l'activitat del FT NF- κ B indirectament, a través de mediadors com SIRT1, FOXO i PGC-1 α , dels qual es parlarà a continuació.

SIRT1

SIRT1, és una proteïna involucrada en processos de longevitat induïda per restricció calòrica (Sinclair i Guarente, 2006). Així doncs, el dèficit energètic en l'organisme es tradueix en un increment del quocient AMP/ATP que activa processos de β -oxidació a través de l'AMPK, els quals donen lloc a un increment del ràtio NAD⁺/NADH que condueix en última instància a una activació de SIRT1. Aquesta proteïna desacetila LKB1 permetent que formi un complex citoplasmàtic juntament amb les proteïnes STRAD i MO25, conduint a la fosforilació i conseqüent activació de l'AMPK (Lan i col., 2008; Cantó i col., 2009) (**Figura 10**).

Estudis realitzats per Yeung i col. (2004) van demostrar que SIRT1, una vegada activada podia desacetilar la subunitat p65 del FT NF- κ B en residus de Lys³¹⁰, inhibint la seva activitat transcripcional. Altres investigadors van observar que aquest fet afavoria la metilació de p65 en residus de Lys³¹⁴ i Lys³¹⁵, conduint a la seva

ubiquitinització i conseqüent degradació (Yang i col., 2010a). Així doncs, s'ha demostrat que molts polifenols que ingerim en la dieta, tals com el resveratrol present en la pell del raïm negre, poden exercir efectes antiinflamatoris en l'organisme mitjançant l'activació de l'AMPK i conseqüent desacetilació de p65 a través de SIRT1 (Chung i col., 2010). Estudis realitzats per Lim i col. (2013) van destacar que l'oleat també era capaç d'incrementar l'oxidació dels AG en múscul esquelètic mitjançant un mecanisme que involucrava SIRT1 i la PKA. Així, en els seus experiments van incubar miotubs C2C12 amb oleat i l'EX-527 (inhibidor de SIRT1), així com amb l'H-89 (inhibidor de la PKA), i van observar una marcada reducció en l'oxidació dels AG, suggerint que l'oleat incrementava l'oxidació dels AG per un mecanisme que involucrava aquestes proteïnes.

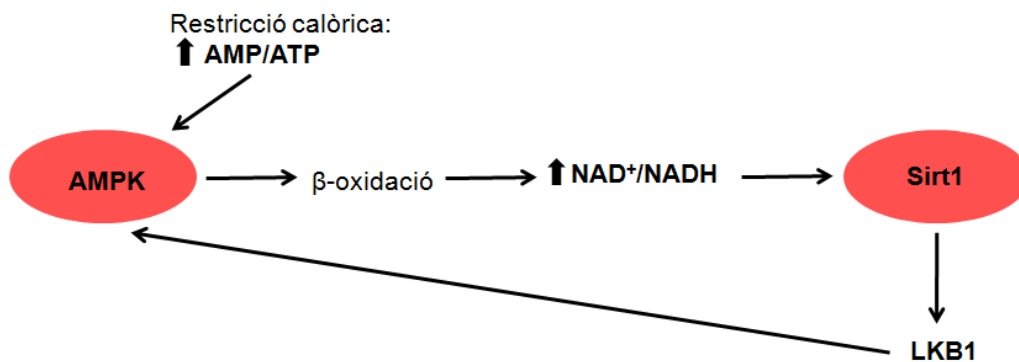


Figura 10. Estats de dèficit energètic en la cèl·lula condueixen a l'activació de SIRT1 per un mecanisme que involucra la cinasa AMPK. SIRT1, al seu torn, és capaç de desacetilar i com a conseqüència activar LKB1, proteïna encarregada de fosforilar i activar l'AMPK.

FOXO

Un altre possible mecanisme mitjançant el qual l'AMPK és capaç d'inhibir processos inflamatoris és a través del FT FOXO. La família FOXO està formada per quatre membres (FOXO1, FOXO3a, FOXO4 i FOXO6), els quals s'encarreguen de regular diferents processos en l'organisme, tals com el metabolisme de la glucosa i processos antiinflamatoris (Salminen i col., 2011). Cal destacar el paper antiinflamatori de l'AMPK mitjançant la fosforilació directa de FOXO3a (Lin i col., 2004; Greer i col., 2007) o bé de manera indirecta a través de l'activació de SIRT1, que al seu torn es pot unir a FOXO4 i activar-lo (Kobayashi i col., 2005; Zhou i col., 2009).

PGC-1 α

Tenint en compte que, tal com s'ha detallat en capítols anteriors, el coactivador PGC-1 α té un important paper en la regulació de l'expressió de gens involucrats en l'oxidació d'AG, estudis realitzats per Gerhart-Hines i col. (2007) van demostrar que aquest podria ser el mecanisme responsable de què cèl·lules de múscul esquelètic poguessin sobreviure sota condicions de restricció calòrica. Aquests autors van observar que SIRT1 jugava un paper important en la regulació posttranscripcional de PGC-1 α , activant-lo per desacetilació. Cal destacar també el paper de l'AMPK a l'hora de fosforilar PGC-1 α , permetent que pugui ser desacetilat i conseqüentment activat per part de SIRT1 (Salminen i col., 2011). Per tal de conèixer el paper de PGC-1 α en el procés inflamatori, Kim i col. (2007) van demostrar que l'increment en l'expressió de PGC-1 α en cèl·lules de múscul llis i cèl·lules endotelials, inhibia l'activitat del FT NF- κ B. En línia amb aquests resultats, Palomer i col. (2009) van observar que la sobreexpressió de *Tnf- α* en el cor de ratolins transgènics reduïa els nivells d'expressió gènica de *Pgc-1 α* , així com també van demostrar que vies moleculars que involucraven el FT NF- κ B i les MAPK eren les responsables de la reducció de l'expressió de PGC-1 α en cèl·lules AC16 incubades amb TNF α . En línia amb aquests resultats, Coll i col. (2006) van destacar que el palmitat reduïa l'expressió de *Pgc-1 α* mitjançant un mecanisme que involucrava NF- κ B, així com la via de les MAPK en cèl·lules de múscul esquelètic. Aquests autors van observar que en coincubar miotubs C2C12 amb palmitat i l'inhibidor de la proteïna ERK1/2 U0126, s'evitava la reducció en els nivells d'expressió gènica de *Pgc-1 α* així com en els nivells proteics d'I κ B α .

4.3. MAPK, inflamació i RI

La família de les MAPKs està formada per proteïnes amb activitat serina/treonina cinasa, essent les més estudiades l'ERK1/2, la p38 (p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$) i la JNK (JNK1/2/3), les quals juguen un paper clau en la transmissió de senyals captats pels receptors de la superfície cel·lular. Aquestes proteïnes presenten funcions fisiològiques participant principalment en el control de l'expressió gènica, proliferació cel·lular i mort cel·lular programada (Chang i Karin, 2001). Les diferents proteïnes de la família de les MAPKs presenten un motiu format per residus de treonina i tirosina en el seu bucle d'activació, els quals han de ser fosforilats per la seva posterior activació. Així doncs, la cascada de les MAPK està formada per tres proteïnes cinases citoplasmàtiques: la MAP cinasa cinasa cinasa (MAPKKK, *Mitogen-activated protein kinase kinase kinase*), que s'encarrega d'activar la MAP cinasa cinasa (MAPKK, *Mitogen-activated protein kinase kinase*) que finalment activa la MAPK. Les MAPKKK

més estudiades han estat les proteïnes Raf, encarregades de regular la via que involucra la cinasa ERK1/2 (Raman i col., 2007).

Tal com s'ha comentat prèviament, les MAPK juguen un paper clau en la regulació de la via de senyalització de la insulina, ja sigui mitjançant la fosforilació de la proteïna IRS en residus de Ser³⁰⁷ (Wellen i Hotamisligil, 2005; Saltiel, 2012), o bé a través de processos inflamatoris activant el FT AP-1 (Davis, 2000; Solinas i Karin, 2010) i NF-κB (Green i col., 2011a). Així, la insulina pot exercir un mecanisme de *feedback* negatiu sobre la seva via de senyalització, de manera que quan s'uneix al seu receptor, aquest fosforila la proteïna IRS la qual s'uneix a Grb2 i aquesta al seu torn, a través de la proteïna SOS (*Son of sevenless*) permet l'activació de Ras. Finalment, la proteïna Ras activa una cascada de cinases que condueix en última instància a activar ERK1/2, capaç d'inhibir la via de senyalització de la insulina (Taniguchi i col., 2006).

Pel que fa a l'activació del procés inflamatori per part de les MAPK, el qual també es pot relacionar estretament amb l'aparició de RI, és ben conegut que aquestes proteïnes condueixen a l'activació de FT que incrementaran l'expressió de *c-FOS* i *c-JUN*, gens que codifiquen per les proteïnes que formen el complex AP-1 encarregat de transcriure gens proinflamatoris (Eferl i Wagner, 2003). Cal destacar que la durada en l'activació de la via de la ERK1/2 determina el paper d'aquesta cinasa pel que fa a la regulació de la composició del FT AP-1. Així doncs, una activació transitòria d'ERK1/2 promou l'expressió de *cFOS*, mentre que l'activació sostinguda d'aquesta via és necessària per l'expressió de la resta de components d'AP-1, tals com *FRA-1*, *FRA-2*, *c-JUN* i *JUNB* (Chalmers i col., 2007) (**Figura 11**).

Una vegada al nucli, el complex AP-1 incrementa la transcripció de gens que codifiquen per citocines tals com la IL-6 i TNF α , les quals poden actuar com estímuls, juntament amb els AG i l'estrès del RE, a l'hora d'activar la via de les MAPK i conduir en última instància a processos inflamatoris i de RI (Hirosumi i col., 2002; Fujishiro i col., 2003; Barbarroja i col., 2010; Solinas i Karin, 2010; Darling i Cook, 2014). Alguns estudis apunten que la cinasa ERK1/2 és capaç d'activar també el FT proinflamatori NF-κB. Així doncs, Green i col. (2011a) van demostrar que l'addició de palmitat a miotubs L6 conduïa a la fosforilació de la proteïna IKK mitjançant un mecanisme que involucrava la MAPK ERK1/2, de manera que la cinasa IKK era capaç de fosforilar la proteïna inhibidora d'NF-κB IκB α , permetent la translocació d'aquest FT al nucli. Per tant, cal destacar l'important paper de la proteïna ERK1/2 a l'hora de donar lloc a estats de RI ja que, a més d'activar la proteïna IKK relacionada estretament amb la fosforilació d'IRS en Ser³⁰⁷ (Perkins i col., 2007), és capaç d'incrementar la transcripció

de citocines proinflamatòries a través dels FTs NF- κ B i AP-1 (Eferl i Wagner, 2003; Green i col., 2011a) (**Figura 11**).

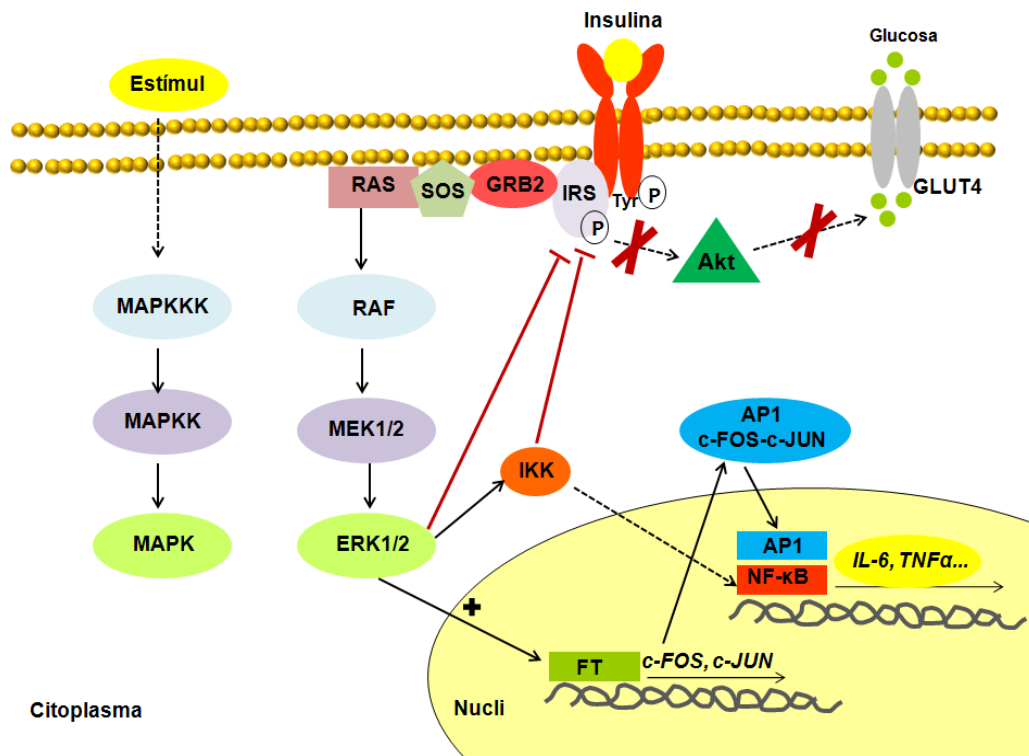


Figura 11. Esquema de la cascada de les MAPK la qual pot ser activada per estímuls tals com els AG, les citocines proinflamatòries, l'estrès del RE, així com la pròpia insulina regulant negativament la via de senyalització que involucra l'activació d'AKT i posterior entrada de glucosa a la cèl·lula.

Regulació negativa de les proteïnes AMPK i ERK1/2

Alguns autors han descrit la presència d'una regulació negativa entre les proteïnes AMPK i ERK1/2. Així, Du i col. (2008) van demostrar en fibroblasts cardíacs que l'activació de l'AMPK mitjançant l'AICAR era capaç d'inhibir la fosforilació induïda per sèrum de la proteïna ERK1/2 i de la seva diana p70S6K. Estudis posteriors van confirmar l'existència d'aquesta regulació negativa en observar que la reducció de la fosforilació de l'AMPK en fetge de ratolins alimentats amb un dieta rica en greixos s'acompanyava d'un increment en els nivells de fosforilació de la proteïna ERK1/2 (Barroso i col., 2011). Recentment, Hwang i col. (2013) han demostrat que la inhibició de la proteïna ERK1/2 podria activar vies de senyalització que involucraven l'AMPK i l'AKT, evitant així la RI induïda per l'estrès del RE en miotubs L6.

4.4. Efecte dels AG en les vies inflamatòries implicades en la RI

És àmpliament conegut que en estats de RI s'observa un increment en els nivells d'AG lliures en l'organisme, la composició dels quals ve definida en gran part pels greixos presents en la dieta (Fielding i col., 1996). Cal destacar que no tots els AG juguen el mateix paper a l'hora d'activar les vies inflamatòries implicades en la RI. Així, mentre que els AG saturats activen processos inflamatoris, els AG insaturats poden activar-los o inhibir-los. En termes generals es considera que els AG poliinsaturats de la sèrie ω -6 activen vies inflamatòries, mentre que els de la sèrie ω -3 juntament amb els monoinsaturats, es consideren antiinflamatoris (Calder i col., 2011; Yang i col., 2011; Wendell i col., 2014). No obstant, cal destacar que alguns AG poden jugar un paper antiinflamatori en uns teixits, i proinflamatori en altres, tal com s'ha demostrat en el cas d'un dels metabòlits de l'àcid linoleic, la prostaglandina E2 (PGE2, *Prostaglandin E2*). Així, Wendell i col. (2014) afirmen que la PGE2 es considera proinflamatòria donat el seu paper sobre el sistema immune, tot i que a nivell respiratori ha demostrat tenir efectes antiinflamatoris. A més, estudis realitzats per Coll i col. (2010b) van confirmar els efectes antiinflamatoris de la PGE2 en miotubs C2C12 en observar que aquesta era capaç d'atenuar la inflamació induïda per l'AG saturat palmitat (**Figura 12**).

AGs i metabòlits implicats en processos inflamatoris

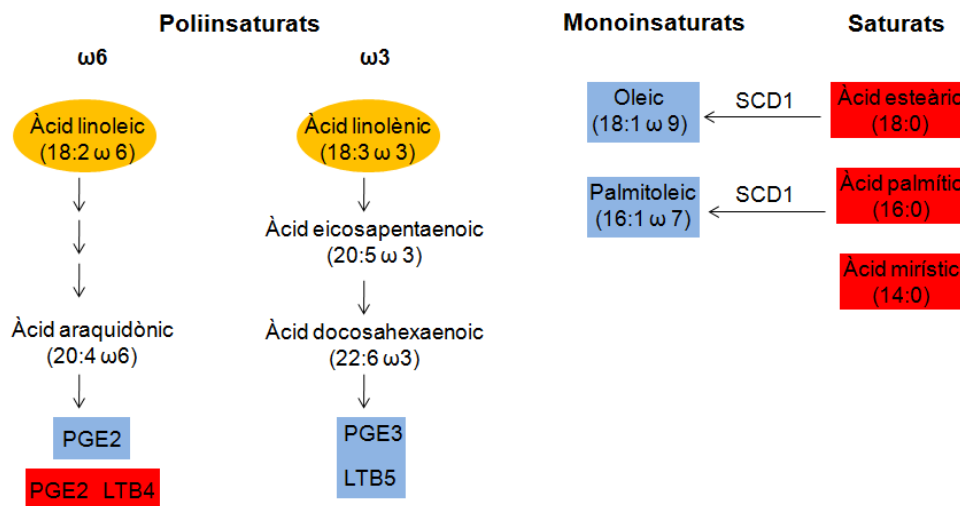


Figura 12. Esquema simplificat de les rutes biosintètiques dels principals AG implicats en processos inflamatoris. En color groc s'indiquen els AG essencials, és a dir, els AG que l'organisme no pot sintetitzar per sí mateix i que cal ingerir-los amb la dieta. En vermell s'indiquen els AG o metabòlits d'AG amb efectes proinflamatoris, i en blau s'indiquen els antiinflamatoris. Cal destacar el paper de l'enzim SCD1 a l'hora d'introduir insaturacions en els AG saturats esteàric i palmític, convertint-los en els AG monoinsaturats oleic i palmitoleic, respectivament (Lottenberg i col., 2012; Wang i col., 2014; Wendell i col., 2014).

Considerant les propietats proinflamatòries associades als AG saturats, Jové i col. (2006) van demostrar que el palmitat activava vies inflamatòries que conduïen a estats de RI en cèl·lules de múscul esquelètic. En posteriors estudis es va observar que l'oleat, no només no activava vies inflamatòries, sinó que era capaç de revertir els efectes proinflamatoris del palmitat evitant així la RI en múscul esquelètic (Coll i col., 2008).

Per tant, considerant l'important paper dels AG sobre el procés inflamatori, diferents investigadors s'han centrat en estudiar com s'inicia aquesta resposta inflamatòria a nivell molecular (Glass i Olefky, 2012). En termes generals es poden definir dues vies mitjançant les quals els AG poden activar processos inflamatoris: via dependent de receptor i via independent de receptor.

Via dependent de receptor

Diferents estudis apunten què els efectes proinflamatoris dels AG saturats tenen lloc, almenys en part, mitjançant l'activació dels TLR (Shi i col., 2006; Schaeffler i col., 2009; Jialal i col., 2014). En mamífers s'han identificat fins a dotze membres de la família dels TLR, els quals són glicoproteïnes de membrana que presenten un domini N-terminal extracel·lular altament conservat, i un domini C-terminal intracel·lular conegut com TIR (*Toll/IL-1 receptor*), donat la seva homologia amb el receptor d'IL-1 (Janeway i Medzhitov, 2002). Cal destacar que els TLR s'expressen en diferents compartiments cel·lulars, mentre que TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR11 s'expressen en la superfície de la cèl·lula, TLR3, TLR7, TLR8 i TLR9 es localitzen en vesícules a nivell intracel·lular. A més, s'ha observat que quan aquests receptors s'associen a lligands formen heterodímers o homodímers, essencials per què s'iniciï la via de senyalització que involucra aquests TLR. Així doncs, la unió dels TLR a lligands permet la seva activació i conseqüent unió dels dominis TIR intracel·lulars d'aquests receptors a proteïnes adaptadores com TIRAP (*TIR domain containing adaptor protein*), que farà d'enllaç entre els TLR i la proteïna MyD88 (*Myeloid differentiation primary response 88*). Cal destacar que la via de senyalització que involucra la proteïna adaptadora MyD88, és utilitzada per tots els TLR excepte el TLR3. La unió de MyD88 mitjançant TIRAP als dominis intracel·lulars dels TLR, permet reclutar les cinases IRAK (*IL-1 receptor-associated kinase*), les quals mitjançant TRAF6 (*TNF receptor associated factor 6*) activaran TAK1 (*Transforming growth factor β (TFG- β)-activating kinase 1*), conduint en última instància a l'activació dels FTs proinflamatoris NF- κ B i AP-1 per un mecanisme que involucra el complex IKK i la via de les MAPK (Kumar i col., 2009) (**Figura 13**).

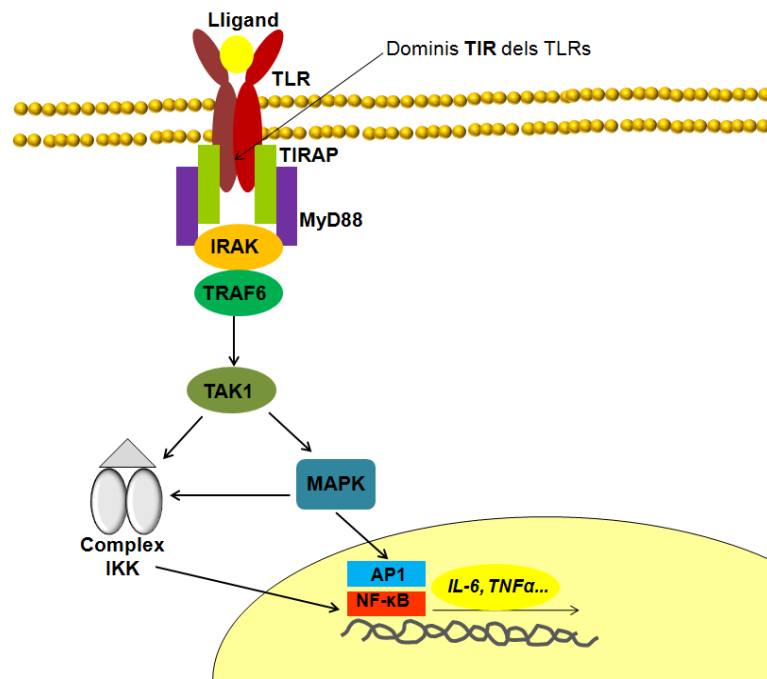


Figura 13. Implicació dels TLR en les vies inflammatòries. Quan els TLR s'uneixen als seus lligands, s'activa la via de senyalització que involucra les proteïnes adaptadores TIRAP, MyD88, IRAK, TRAF6 i TAK1, les qual conduïxen en última instància a l'activació dels FT proinflamatoris AP-1 i NF-κB.

Nombrosos estudis demostren que els receptors TLR2 i TLR4 no només estan implicats en la regulació de la resposta immunitària innata (Huang i col., 2012), sinó que els AG saturats, a través de la fetuina A (Pal i col., 2012), poden actuar com a lligands dels mateixos activant vies inflammatòries i, com a conseqüència, incrementant el risc de RI (Shi i col., 2006; Nguyen i col., 2007). Així doncs, ha estat demostrat que l'activació del FT NF-κB per part del palmitat està implicat en l'increment de l'expressió gènica del *TLR4* i *TLR2* en el múscul esquelètic de pacients que presenten DM2 (Reyna i col., 2008), fins al punt que la major disponibilitat d'aquests receptors podria potenciar l'efecte dels AG sobre el procés inflamatori i la RI (Coll i col., 2010b). Tanmateix, resultats obtinguts per Huang i col. (2012) van demostrar que els AG saturats sense conjuguar-se amb BSA, eren capaços d'activar processos inflamatoris mitjançant l'activació dels TLR en macròfags i, a més, van destacar el paper dels AG ω-3 a l'hora d'evitar aquests processos. Holland i col. (2011) en els seus estudis assenyalen a les ceramides com a responsables de la RI causada per l'activació del TLR4. Així, aquests autors proposen que l'activació del TLR4 per part dels AG saturats dóna lloc a una resposta inflamatòria capaç d'activar la síntesi de ceramides, responsables de la inhibició de la via de senyalització de la insulina. Malgrat els nombrosos estudis que correlacionen els nivells de ceramides en plasma amb les citocines circulants i la RI en humans (De Mello i col., 2009; Gill i Sattar, 2009), altres

investigadors no han observat cap relació entre els nivells de ceramides en múscul i l'aparició de RI en els seus experiments (Helge i col., 2011; Helge i col., 2012). A més, estudis realitzats per Jové i col. (2006) van descartar el paper de les ceramides en el procés inflamatori induït per palmitat en miotubs C2C12.

Tenint en compte que els TLR2/4 són capaços d'activar l'enzim NADPH (*Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) oxidasa i consegüentment, incrementar els nivells de ROS (*Reactive oxygen species*) (Dasu i Jialal, 2011), cal destacar que Wen i col. (2011) en un dels seus estudis van observar que els AG saturats, a través de la producció de ROS i posterior activació de l'inflamasoma, incrementaven l'alliberació d'IL-1 β , responsable de l'aparició de RI. A més, atès que l'AMPK és capaç d'inhibir l'enzim NADPH oxidasa (Wang i col., 2010), aquests autors van destacar l'important paper d'aquesta cinasa a l'hora d'inhibir l'inflamasoma i, en última instància, d'evitar la RI induïda per l'increment en els nivells de ROS produït pel palmitat en macròfags (**Figura 14**).

Via independent de receptor

Estudis recents qüestionen la importància dels TLR en la resposta inflamatòria induïda pels AG en múscul esquelètic, atès que en la majoria de teixits la via de les MAPK s'inicia pocs minuts després de l'activació dels TLR (Hoareau i col., 2010) i, en canvi, en múscul esquelètic aquesta resposta no es manifesta fins passades 6-8 hores de l'addició de palmitat (Green i col., 2011a). Aquest retard en l'activació de la via MEK-ERK-NF- κ B en múscul esquelètic podria reflectir el temps que es requereix per acumular intermediaris lipídics derivats del palmitat fins arribar a un llindar capaç de promoure l'activació de molècules que consegüentment estimularan la via de les MAPK (Macrae i col. 2013). Així doncs, Watson i col. (2009) van demostrar que les PKC noves i convencionals poden ser activades pel DAG en resposta a palmitat. A més, aquestes proteïnes han estat estretament relacionades amb l'activació de la via de senyalització que involucra la proteïna ERK en miotubs L6, a través de la fosforilació de la proteïna inhibidora de Raf RKIP (*Raf-kinase inhibitor protein*) permetent així l'activació de la via proinflamatòria que involucra la proteïna ERK1/2 (Macrae i col. 2013). Així doncs, aquests autors van demostrar que la fosforilació de la proteïna RKIP per part de la PKC, jugava un paper clau en l'activació de les proteïnes ERK i IKK per part del palmitat. A més, estudis realitzats per Coudronniere i col. (2000) van observar que la PKC θ també era capaç d'activar de manera directa la proteïna IKK β . En línia amb aquests resultats, estudis realitzats per Jové i col. (2006) van suggerir que l'activació de la cascada MAPK-ERK per part del palmitat en miotubs

murins estava involucrada en l'increment de l'expressió de *Tnf α* , fet que es relacionava estretament amb l'activació de la PKC θ per part de l'AG saturat en aquest model cel·lular. Estudis posteriors van demostrar que el palmitat s'acumulava principalment en forma de DAG en miotubs C2C12, fet que el relacionava estretament amb l'activació de la PKC θ i en última instància en l'activació de processos inflamatoris (Coll i col., 2008).

Ara bé, Coll i col. (2008) afirmen que no tots els AG es comporten de la mateixa manera a l'hora d'activar vies inflamatòries. En els seus experiments van demostrar que mentre que el palmitat s'acumulava en forma de DAG conduint a estats inflamatoris i de RI, l'oleat no tan sols no activava aquests processos inflamatoris sinó que era capaç d'evitar la inflamació i la RI ocasionades pel palmitat en miotubs C2C12. En conseqüència, aquests autors van incubar els miotubs murins amb palmitat, oleat i etomoxir (compost inhibidor de la Cpt-1 i, per tant, de la β -oxidació dels AG), demostrant així que l'oleat evitava processos inflamatoris, així com l'acumulació de DAG i posterior activació de la via PKC θ -NF- κ B mitjançant mecanismes que involucraven un increment en l'oxidació dels AG. En conseqüència, l'oleat exercia un paper protector front la inflamació i la RI induïda pel palmitat promovent l'acumulació dels AG en forma de TG. Aquests autors van destacar que l'activació dels receptors nuclears PPAR α per part de l'oleat en miotubs C2C12, podria jugar un paper important a l'hora d'incrementar la transcripció de gens involucrats en la síntesi de TG, l'acumulació dels quals no conduïa a estats d'inflamació i RI en múscul esquelètic (Finck i col., 2005; Listenberger i col., 2003). Posteriors estudis van confirmar que l'oleat exercia els seus efectes antidiabètics afavorint l'acumulació dels AG en forma de TG, evitant així l'estrès del RE responsable de la RI induïda pel palmitat en múscul esquelètic (Peng i col., 2011). Experiments realitzats per Sparks i col. (2014) van recolzar la importància d'incorporar els AG en forma de TG en la prevenció de la diabetis, ja que van demostrar que pacients amb DM2 presentaven una reducció en la incorporació dels AG en forma de TG en múscul esquelètic respecte individus sans.

De la mateixa manera que l'oleat és capaç d'evitar processos inflamatoris i de RI incrementant processos de β -oxidació (Coll i col., 2008), estudis realitzats per Steinberg i col. (2006) van proposar que la cinasa AMPK, en ser capaç d'incrementar la β -oxidació dels AG, podria jugar un paper clau a l'hora d'evitar l'activació de vies inflamatòries que condueixen a RI. Així, la disminució de l'activitat d'aquesta cinasa en l'organisme conduïa a una reducció de l'oxidació d'AG (Steinberg i col., 2006), fet que afavoria l'acumulació de DAG i conduïa en última instància a RI. En diferents estudis es proposa que, tant les citocines proinflamatòries (TNF α i IL-6) com les dietes riques

en AG, podrien estar implicades en la reducció de l'activitat de l'AMPK (Yang i col., 2010b; Steinberg i col., 2006; Ko i col., 2009).

A continuació es detalla el paper dels AG palmitat i oleat sobre les vies inflamàtores que condueixen a RI en múscul esquelètic (**Figura 14**).

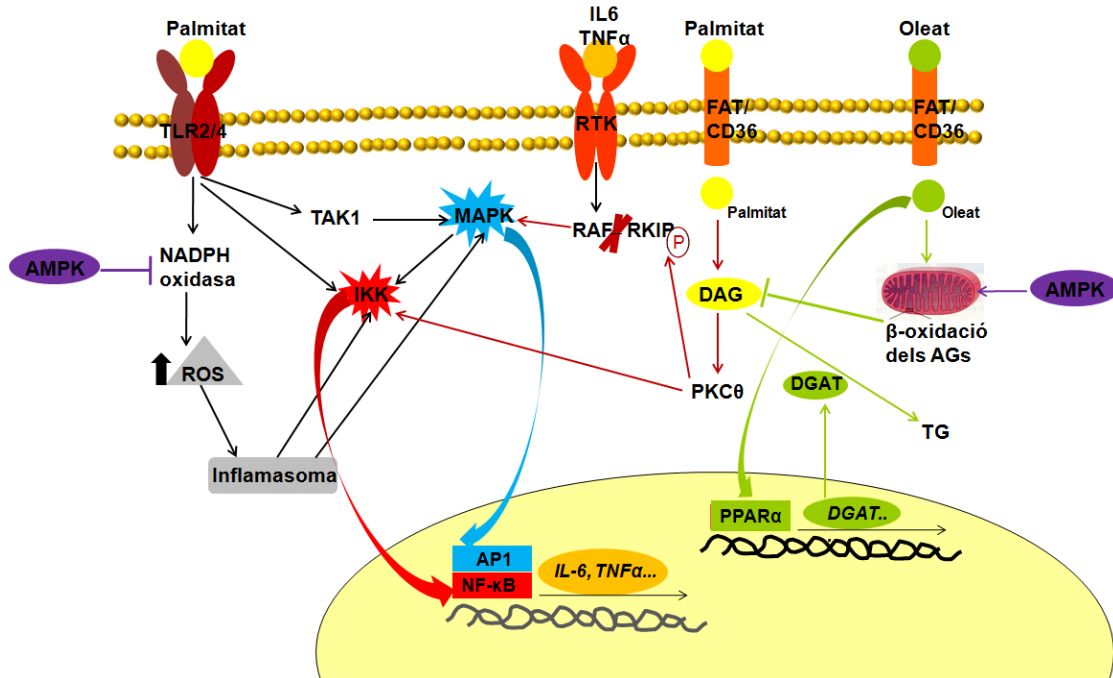


Figura 14. Efecte dels palmitat i l'oleat sobre les vies inflamàtores que condueixen a RI. El palmitat, ja sigui mitjançant la unió als TLR 2/4 o bé per acumulació en forma de DAG és capaç d'activar les vies inflamàtores que involucren les cinases MAPK i IKK. En canvi, l'oleat exerceix efectes antiinflamatoris afavorint l'acumulació dels AG en forma de TG, així com incrementant la β -oxidació del mateixos. L'activació d'aquestes vies inflamàtores es relaciona estretament amb la inhibició de la via de senyalització de la insulina.

4.5. PPAR, inflamació i RI

Atès que hi ha una estreta relació entre la inflamació crònica de baixa intensitat i la RI i, tenint en compte que els PPAR han demostrat tenir un important paper antiinflamatori en l'organisme, aquests s'han proposat com a possibles dianes terapèutiques per al tractament de la DM2 (Wahli i Michalik, 2012).

Cal destacar que $PPAR\alpha$ incrementa l'expressió d' $I\kappa B\alpha$, la qual juga un paper antiinflamatori en l'organisme (Delerive i col., 2002). Ja que l'oleat activa aquest receptor nuclear en miotubs C2C12, Coll i col. (2008) van proposar que aquest fet es podria relacionar estretament amb la capacitat antiinflamatòria de l'oleat, de manera que mitjançant l'increment en els nivells d'expressió gènica de *Dgat2* (enzim responsable de la síntesi de TG a partir de DAG) evitaria els efectes proinflamatoris del DAG.

En el cas de PPAR β/δ ha estat descrit que l'activació d'aquest receptor mitjançant GW501516 és capaç d'incrementar l'oxidació d'AG en cèl·lules de múscul esquelètic humà mitjançant un mecanisme que involucra la proteïna AMPK (Krämer i col., 2007). De fet, Coll i col. (2010a) van demostrar la importància del GW501516 per a evitar la RI induïda per palmitat en miotubs C2C12 mitjançant l'increment en l'expressió gènica de *Cpt-1* i *Pdk4* (*Pyruvate dehydrogenase kinase 4*) (gens diana de PPAR β/δ), així com facilitant la fosforilació de la proteïna AMPK. A més, donada l'estreta relació entre processos inflamatoris crònics de baixa intensitat i l'aparició de RI, aquests autors indiquen que el GW501516 redueix l'activitat del FT proinflamatori NF- κ B incrementada pel palmitat, evitant l'acumulació dels AG en forma de DAG. Altres estudis proposen que PPAR β/δ pot afectar a la composició de les fibres musculars, fet que s'ha relacionat amb l'aparició de RI i DM2. Així, l'increment de PPAR β/δ en múscul, ja sigui mitjançant tècniques de sobreexpressió o a través de la realització d'exercici físic, indueix un canvi en la composició de les fibres musculars cap a fibres amb major capacitat oxidativa, fet que resulta interessant per la prevenció de l'obesitat i la RI (Luquet i col., 2003). A més, Lendoye i col. (2011) van demostrar que l'activació de PPAR β/δ conduïa a un canvi estructural de la proteïna AMPK reduint l'expressió de la subunitat $\gamma 3$ en múscul esquelètic, fet que s'observava també en el múscul esquelètic després de la realització d'exercici. Aquest fet és interessant atès que l'augment en l'expressió d'aquesta subunitat $\gamma 3$ es correlaciona negativament amb la captació de glucosa (Mortensen i col., 2009).

D'altra banda, cal destacar que PPAR β/δ també juga un paper important a l'hora d'evitar l'aparició de processos inflamatoris que precedeixen la RI en adipòcits i hepatòcits. Així, Rodríguez-Calvo i col. (2008) van observar que ratolins deficientes en PPAR β/δ presentaven major activitat del FT NF- κ B en adipòcits, així com nivells d'expressió gènica d'*Il-6* superiors respecte ratolins que no presentaven aquesta deficiència. Aquests investigadors també van correlacionar la baixa expressió de PPAR β/δ en el teixit adipós en rates diabètiques ZDF amb l'activació del procés inflamatori. Estudis posteriors van demostrar el paper protector de PPAR β/δ front la RI induïda per processos inflamatoris. Així, l'activació farmacològica d'aquest FT mitjançant GW501516 en adipòcits i en hepatòcits evitava la reducció en els nivells de fosforilació de la proteïna AKT induïda per la citocina proinflamatòria *Il-6* (Serrano-Marco i col., 2011; Serrano-Marco i col., 2012).

Tanmateix, estudis realitzats per Odegaard i col. (2008) van demostrar que PPAR β/δ , en resposta a *IL-4* afavoria un fenotip alternatiu en macròfags hepàtics. Aquests autors proposen que mentre que la resposta inflamatòria produïda pels

macròfags potencia la RI en casos d'obesitat, els macròfags amb el fenotip alternatiu induït per PPAR β/δ participaven en la millora de la DM2. Els estudis realitzats per Kang i col. (2008) van confirmar la importància de PPAR β/δ en la regulació de la resposta inflamatòria en macròfags del teixit adipós. Aquests autors van demostrar que adipòcits incubats juntament amb macròfags deficientes en PPAR β/δ presentaven nivells elevats de citocines proinflamatòries així com alteracions en el metabolisme, respecte adipòcits que s'havien incubat amb macròfags que no presentaven aquesta deficiència genètica.

En definitiva, tots aquests resultats apunten a PPAR β/δ com a possible diana terapèutica pel tractament de la DM2. De fet, cal destacar que l'administració d'un agonista de PPAR β/δ a ratolins que presentaven diabetis va reduir els nivells de glucèmia, alhora que va incrementar la sensibilitat a la insulina i la funcionalitat dels illots pancreàtics (Winzell i col., 2010). A més, cal destacar que el GW501516 també ha demostrat la seva eficàcia en assajos clínics pel tractament de dislipèmies (Risèrus i col., 2008). Malgrat tots aquests resultats positius en estudis preclínic que suggereixen que els lligands de PPAR β/δ podrien presentar eficàcia per al tractament de la RI i la DM2 (Coll i col., 2010a), l'ús d'aquests possibles fàrmacs per al tractament d'aquestes patologies queda limitat atès que són patologies que requereixen tractaments de llarga durada, i els efectes d'aquests fàrmacs a llarg termini (>6 mesos) actualment són desconeguts en humans i s'han relacionat amb processos de carcinogènesi en models animals (Reed i col., 2004; Peters i col., 2011). Ara bé, cal tenir en compte que aquest fet també ha estat descrit amb els activadors de PPAR α . De fet, aquests activadors poden provocar tumors hepàtics en tractaments crònics en rosegadors, però aquests tumors no s'han detectat mai després d'haver utilitzat uns activadors de PPAR α com els fibrats durant dècades en el tractament de les dislipidèmies (Roglans i col., 2002; Kawai col., 2008).

5. Estrès del RE

El RE és un orgànu cel·lular present en cèl·lules eucariòtiques, el qual intervé en funcions relacionades amb la síntesi, plegament i transport intracel·lular de proteïnes. A més, cal destacar que aquest orgànu també juga un paper important en la síntesi de lípids i en l'emmagatzematge intracel·lular de calci (Park i col., 2010a). Atès que una de les principals funcions del RE és facilitar que les proteïnes assoleixin l'estructura que els confereix activitat i empaquetar-les de manera que aquestes puguin ser desplaçades a la superfície cel·lular, Walter i Ron (2011) proposen que aquest orgànu exerceix un control de qualitat sobre les proteïnes que fabrica.

D'aquesta manera, en cas de detectar una acumulació de proteïnes malplegades en el lumen, aquestes seran transportades al citosol i degradades al proteosoma per mitjà d'un mecanisme conegut com ERAD (*Endoplasmic reticulum-associated degradation*). Així, l'acumulació de proteïnes malplegades o desplegadas en el lumen del RE degut a una reducció en la funcionalitat del mateix, condueix a una situació coneguda com a estrès del RE. Per tal de restablir l'homeòstasi cel·lular, aquest orgànu activa unes vies de senyalització en resposta a proteïnes desplegadas que es coneixen amb el nom d'UPR (Lee i Ozcan, 2014), les quals alteren els mecanismes transcripcionals i traduccionals de la cèl·lula (Zhang i Kaufman, 2008) per tal de reduir la carga proteica que entra al RE i, d'altra banda, incrementar la transcripció dels seus gens diana. Entre aquests gens diana destaquen els que codifiquen per xaperones que tenen com a funció el correcte plegament proteic en el propi orgànu, així com les proteïnes responsables de l'activació de processos d'ERAD (Ron i Walter, 2007) i, en última instància, en cas de que no es pugui restablir l'homeòstasi en la cèl·lula, proteïnes encarregades d'induir la mort cel·lular. Cal destacar que aquesta resposta pot manifestar-se de forma aguda en l'organisme per tal de restablir l'homeòstasi en el RE, o bé es pot manifestar de forma crònica conduint a l'aparició de determinades patologies (Marciniak i Ron, 2006). Tot i que resten molts estudis per tal d'entendre quina és la funció de la UPR, Ozcan i col. (2004) van proposar que aquesta resposta jugava un paper important en la patogènesi de la DM2.

Cal destacar la regulació negativa d'aquesta UPR per part de la proteïna d'unió a immunoglobulines (BIP, *Immunoglobulin-heavy-chain-binding protein*), coneguda també com a proteïna de 78 KDa regulada per glucosa (GRP78, *78 kDa Glucose-regulated protein*), la qual inactiva les proteïnes transmembrana transductores d'aquesta resposta mitjançant la seva unió als dominis intraluminals: PERK, IRE1 α i ATF6. En situacions d'estrès del RE, la xaperona BIP se separa de les proteïnes transmembrana i s'uneix a proteïnes desplegadas o malplegades presents en el lumen del RE facilitant-ne el seu plegament (Harding i col., 1999; Bertolotti i col., 2000). Cal destacar també el paper d'altres xaperones, tals com la proteïna de 150 KDa regulada per oxigen (ORP150, *Oxygen-regulated protein 150*) que s'activa durant la UPR per tal de restablir l'homeòstasi del RE (Nakatani i col., 2005; Ozawa i col., 2005). Així doncs, Kammoun i col. (2009) van demostrar que la sobreexpressió de la xaperona BIP en el fetge de ratolins obesos tenia efectes metabòlics beneficiosos. Recentment, importants estudis han centrat les seves investigacions en entendre com s'activa aquesta UPR, i varis autors apunten que cadascuna de les branques de la UPR està regulada independentment (Ron i Walter, 2007; Walter i Ron, 2011).

PERK és una proteïna transmembrana amb un domini luminal que actua com a sensor de proteïnes malplegades o desplegadas i un domini citoplasmàtic amb activitat cinasa. Així, quan augmenten els nivells d'aquestes proteïnes en el lumen del RE, la xaperona BIP se separa de PERK (Ron i Walter, 2007) i, conseqüentment, té lloc l'homodimerització i posterior transautofosforilació d'aquesta proteïna transmembrana. Aquesta, al seu torn fosforila en Ser⁵¹ el factor d'iniciació eucariòtica 2 α (eIF2 α , *Eukaryotic initiation factor 2 α*), conduint finalment a la inhibició de la síntesi de proteïnes (Ma i col., 2002). Així doncs, l'activació de la via que involucra PERK evita l'entrada de nous polipèptids dins al lumen del RE, reduint així la carga proteica en aquest orgànul i promovent la supervivència cel·lular (Harding i col., 2000). Cal destacar que la fosforilació d'eIF2 α juga un paper clau en la transcripció d'ATF4 (*Activating transcription factor 4*), el qual pot actuar com a FT de gens que codifiquen per les proteïnes que participen en la UPR, involucrades en processos de síntesi i transport d'aminoàcids, resistència a l'estrès oxidatiu, així com en processos d'apoptosi induïda per l'estrès del RE (Harding i col., 2003; Lu i col., 2004). ATF4 també incrementa la transcripció de gens proapoptòtics tals com la proteïna homòloga al FT C/EBP (CHOP, *C/EBP (CCAAT/enhancer-binding protein) homologous protein*) (Zinszner i col., 1998), que al seu torn pot incrementar la transcripció d'altres gens involucrats en processos d'apoptosi com el *GADD34 (Growth arrest and DNA-damage-inducible protein-34)*, el qual exerceix un mecanisme de *feedback* negatiu en la via que involucra la proteïna eIF2 α (Ron i Walter, 2007).

IRE1 es pot trobar en dues isoformes en mamífers, IRE1 α i IRE1 β . Mentre que la isoforma α s'expressa de manera ubiqüa en l'organisme, la β es troba principalment a nivell intestinal (Martino i col., 2013). Cal destacar que, així com IRE1 α ha demostrat tenir un paper important en la UPR, IRE1 β no sembla participar en aquest procés. A nivell estructural IRE1 és una proteïna transmembrana formada per un domini luminal (sensor de l'estat de plegament de les proteïnes) i un domini citoplasmàtic que al seu torn conté un domini amb activitat serina/treonina cinasa i un altre amb activitat RNasa (Cox i col., 1993). En condicions d'homeòstasi cel·lular, IRE1 α es troba en forma de monòmer associada a la xaperona BIP. Ara bé, en condicions d'estrès al RE aquesta proteïna forma homodímers i oligòmers i com a conseqüència se separa de BIP (Bertolotti i col., 2000). Per tant, la dimerització o oligomerització d'aquesta proteïna condueix a transautofosforilar-se en residus de Ser⁷²⁴ en mamífers (Lee i Ozcan, 2014). Aquesta fosforilació permet l'activació del seu domini RNasa, que al seu torn produeix l'*splicing* del gen que codifica per la proteïna d'unió a la caixa X1 (*uXBP1*,

unspliced X-box binding protein 1) convertint-lo en un gen amb 26 nucleòtids menys conegut com a *sXBP1* (*spliced XBP1*) el qual codifica per un FT actiu. En determinades situacions, *sXBP1* pot translocar al nucli i incrementar la transcripció de gens involucrats en la UPR, els quals codifiquen per les xaperones responsables del plegament de proteïnes, biogènesi del RE, així com processos d'ERAD (Yoshida i col., 2001). A més, és de gran rellevància destacar la participació d'*sXBP1* en processos independents de la UPR, tals com l'adipogènesi, el metabolisme lipídic, així com els processos inflamatoris (Sha i col., 2011). Diferents estudis han proposat que l'activitat endoribonucleasa d'*IRE1 α* pot promoure la degradació d'mRNAs que codifiquen per proteïnes estructurals del RE o proteïnes que s'hagin de secretar, les quals presenten alteracions estructurals (Hollien i Weissman, 2006; Han i col., 2009; Hollien i col., 2009).

Cal destacar que *IRE1 α* pot interaccionar amb multitud de proteïnes i formar el que es coneix com "interactoma *IRE1 α* ", responsable de modular en gran part les funcions d'aquesta proteïna (Hetz i Glimcher, 2009). Aquest interactoma està format per les proteïnes *BCL2* (*B cell lymphoma 2*), *BAX* (*BCL2-associated X protein*), *BAK* (*BCL2-antagonist/killer*), *AIP1* (*ASK (Apoptosis signal-regulating kinase 1)-interacting protein 1*), *TRAF2* (*TNF receptor-associated factor 2*), *BI-1* (*BAX inhibitor-1*) i *RACK1* (*Receptor for activated C-kinase 1*) (Sha i col., 2011). Així, el complex *BAX/BAK*, de la mateixa manera que la proteïna *AIP1* són claus per l'òptima activació d'*IRE1 α* (Hetz i col., 2006). En canvi, *BI-1* interacciona amb *IRE1 α* de manera que aquest complex regula negativament aquesta proteïna (Lisbona i col., 2009; Bailly-Maitre i col., 2010). A més, *RACK1* ha demostrat regular negativament la proteïna en qüestió reclutant la fosfatasa *PP2A* que s'encarrega de desfosforilar i, per tant, inhibir *IRE1 α* (Qiu i col., 2010). A més, Zhang i col. (2001) van demostrar que *IRE1 α* en associar-se a *TRAF2* era capaç d'activar *ATF3* donant lloc a apoptosis en cèl·lules endotelials.

Estudis recents han demostrat que la *MAPK p38* pot regular l'activitat d'*sXBP1* fosforilant aquest FT en residus de Thr⁴⁸ i Ser⁶¹, facilitant així la seva translocació al nucli (Lee i col., 2011b). A més, diferents estudis proposen que l'activitat del FT *sXBP1* pot estar regulada a nivell posttranscripcional mitjançant processos de sumolització (*SUMO*, *Small ubiquitin-like modifier*) i acetilació, els quals poden reduir o activar, respectivament, aquest FT (Chen i Qi, 2010; Wang i col., 2011a). D'altra banda, la via de senyalització de la insulina va demostrar regular positivament l'activitat d'*sXBP1* mitjançant la interacció física amb la subunitat reguladora de *PI3K*. Així, la interacció de *p85* amb l'*sXBP1* facilita la translocació d'aquest FT al nucli (Park i col., 2010b; Winnay i col., 2010). Zhou i col. (2011) van observar que *XBP1* també era capaç

d'unir-se a FOXO1 i degradar-lo, suggerint que aquest podria ser un dels mecanismes mitjançant el qual l'XBP1 regularia l'homeòstasi de la glucosa. A més, Hotamisligil (2010) va destacar la importància d'sXBP1 a l'hora de regular la transcripció de gens involucrats en la síntesi d'AG, tals com l'*Scd-1* i el *Dgat2*. D'aquesta manera, experiments realitzats per Lee i col. (2008) van demostrar que ratolins que presentaven una deficiència en *sXbp1* específica de fetge, mostraven una reducció en els nivells de TG i colesterol plasmàtics.

ATF6 és una proteïna transmembrana del RE amb un domini citoplasmàtic actiu com a FT, i un domini luminal que actua com a sensor d'alteracions del RE (Haze i col., 1999). De la mateixa manera que en el cas de PERK i IRE1 α , alteracions del RE condueixen a la separació de BIP i ATF6, permetent que aquest darrer transloqui a l'aparell de Golgi (Shen i col., 2002) on és substrat de les proteases S1P (*Site-1 protease*) i S2P. Com a conseqüència, el domini N-terminal (citoplasmàtic) d'ATF6 és alliberat, activant-se com a FT, el qual en translocar al nucli incrementa la transcripció dels seus gens diana, tals com l'*XBP1* (Haze i col., 1999; Ye i col., 2000), i gens que codifiquen per enzims encarregats de promoure el plegament, maduració, secreció i processos d'ERAD (Wu i col., 2007a; Yamamoto i col., 2007). Tal com s'ha comentat prèviament, en cas que les vies activades en resposta a l'estrès del RE no puguin restablir l'homeòstasi cel·lular, aquestes condueixen a apoptosi. Així, a més de la via PERK-eIF2 α -ATF4, la via d'ATF6 també juga un paper important en l'activació de processos d'apoptosi incrementant la transcripció de *CHOP*. Malgrat que el mecanisme mitjançant el qual CHOP induïx apoptosi en la cèl·lula no es coneix amb exactitud, alguns autors han descrit que aquest és capaç d'incrementar la transcripció de gens proapoptòtics, tals com el BIM (*BH3-only protein*), el TRB3 i el DR5 (*Death receptor*), responsables de promoure l'estrès oxidatiu en la cèl·lula (Yamaguchi i Wang, 2004; Ohoka i col., 2005; Puthalakath i col., 2007; Song i col., 2008).

Cal destacar que nombroses vies metabòliques poden regular ATF6. Així, estudis realitzats per Thuerauf i col. (1998), van demostrar que la MAPK p38 era capaç de fosforilar i, com a conseqüència, activar ATF6. Estudis posteriors realitzats per Yamamoto i col. (2007) també van observar que l'heterodimerització entre ATF6 i XBP1 conduïa a l'activació de processos d'ERAD.

5.1. Estrès del RE i inflamació

Molts investigadors han centrat els seus experiments en l'estudi dels mecanismes moleculars que condueixen a l'aparició de RI en individus que presenten obesitat. Així, tal com s'ha detallat en capítols anteriors, Saltiel (2012) va proposar que

els processos inflamatoris podrien ser un vincle d'unió entre l'obesitat i la RI. Cal destacar que estudis recents apunten a l'estrès del RE com a responsable de l'aparició dels processos inflamatoris que precedeixen a la RI en casos d'obesitat (Hotamisligil, 2010; Garg i col., 2012).

Tal com ja s'ha mencionat, en estats d'obesitat i sobrenutrició es produeix una estimulació tant de la síntesi com de l'emmagatzematge de TG en el teixit adipós. Aquest fet condueix a una hipertròfia i hiperplàsia dels adipòcits degut a la creixent acumulació de lípids en el seu interior (Hausman i col., 2001). Fruit dels canvis estructurals que sofreixen aquestes cèl·lules per tal d'emmagatzemar de manera correcta els lípids en l'organisme, augmenta la carga proteica en el RE dels adipòcits, fet que pot conduir a alteracions en l'homeòstasi d'aquest orgànu (Hotamisligil, 2010). A més, en casos d'elevada ingesta calòrica els adipòcits alliberen mediadors de la diferenciació adipocitària tals com el $TNF\alpha$ (Hausman i col., 2001), citocina proinflamatòria estretament relacionada amb l'activació de la UPR durant l'estrès del RE (Mandl i col., 2009). Així, experiments realitzats per Hosogai i col. (2007) van demostrar que els nivells d'expressió gènica de *Chop* estaven incrementats en models murins d'obesitat, fet que suggeria que l'elevada síntesi de TG podria desencadenar estrès del RE.

A més, tal com s'ha comentat en capítols anteriors, el teixit adipós intraabdominal es caracteritza per presentar una elevada taxa lipolítica (Tchernof i Després, 2013) i, per tant, és el responsable de l'alliberació d'AGL en casos d'obesitat (Lee i Ozcan, 2014). Aleshores, l'increment en els nivells d'AG saturats com el palmitat podrien explicar l'estrès del RE present en casos d'obesitat (Ozcan i Tabas, 2012).

Estudis recents proposen que l'estrès del RE precedeix processos inflamatoris, que al seu torn seran responsables d'un ampli ventall de patologies en funció del model cel·lular afectat. Així doncs, la inflamació induïda per l'estrès del RE en cèl·lules β pancreàtiques pot conduir a l'aparició de DM2 (Lee i Ozcan, 2014). Atès que el múscul esquelètic es el principal teixit responsable de la captació de glucosa depenent d'insulina (Klip i Pâquet, 1990), estudis recents s'han qüestionat si l'estrès del RE en aquest teixit també podria conduir a estats de RI. D'aquesta manera, Peng i col. (2011) van demostrar que en els seus experiments, l'addició de palmitat a cèl·lules de múscul esquelètic induïa estrès del RE el qual precedia la RI en aquest model cel·lular.

Cal destacar l'existència d'un cercle viciós entre les vies que integren l'estrès del RE amb les vies inflamatòries que precedeixen la RI (**Figura 15**). Així, Xue i col. (2005) van demostrar que l'addició de $TNF\alpha$ a cèl·lules murines de fibrosarcoma conduïa a la formació de ROS, responsable de l'aparició d'estrès del RE en aquest model cel·lular. Per tant, mentre que aquests autors proposen que els processos

inflamatoris condueixen a l'aparició d'estrès del RE, altres investigadors apunten a l'estrès del RE com a responsable de l'aparició de processos inflamatoris (Garg i col., 2012), fet que confirma l'existència d'un cercle viciós entre aquests dos processos (Hotamisligil, 2010).

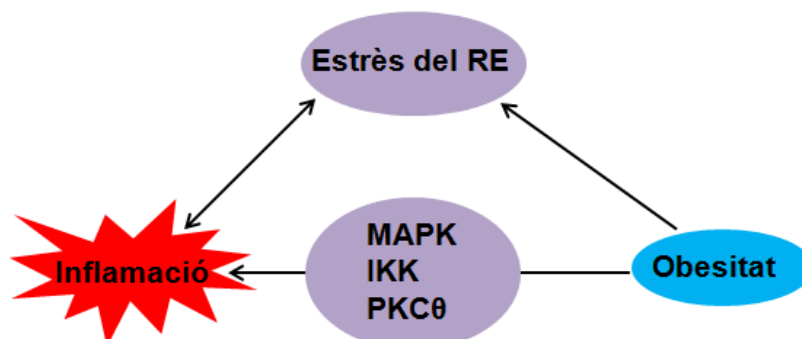


Figura 15. L'obesitat condueix a l'activació de l'estrès del RE així com l'activació d'altres vies metabòliques tals com la via de les MAPK i les vies que involucren les proteïnes IKK i la PKC θ , que al seu torn condueixen a estats inflamatoris. Existeix doncs un cercle viciós entre l'estrès del RE i els processos inflamatoris.

5.1.1 UPR i inflamació

Cal destacar que les tres principals branques de la UPR (PERK, IRE1 α i ATF6) juguen un paper important a l'hora d'activar processos inflamatoris (Verfaillie i col., 2013; Hotamisligil i Erbay, 2008; Zhang i Kaufman, 2008), no obstant, aquestes proteïnes difereixen en els mecanismes moleculars que condueixen a aquesta activació (Garg i col., 2012).

Així, IRE1 α activa NF- κ B mitjançant un mecanisme que involucra la fosforilació de la cinasa IKK, que al seu torn fosforila la proteïna inhibidora d'NF- κ B conduint en última instància a la seva degradació i conseqüent translocació de p50 i p65 al nucli (Hu i col., 2006). Cal destacar que l'sXBP1 activat a partir d'IRE1 α , també actua com a FT incrementant la transcripció de gens proinflamatoris (Flamment i col., 2012). D'altra banda, atès que PERK juga un paper molt important a l'hora d'inhibir la síntesi de proteïnes durant l'activació de la UPR, aquesta proteïna activa NF- κ B a través de la reducció en la síntesi d'I κ B α . Així, Deng i col. (2004) van proposar que, atès que la vida mitja d'I κ B α és més curta que la d'NF- κ B, la inhibició de la síntesi proteica a través de la via que involucra PERK incrementa el ràtio NF- κ B/I κ B α , permetent la translocació d'NF- κ B al nucli en resposta a l'estrès del RE. Osowski i col. (2012) van demostrar que PERK també podia activar vies inflamàtores a través del FT ATF5 en cèl·lules β , el qual incrementava la transcripció de *TXNIP* (*Thioredoxin-interacting protein*), i conduïa així a l'activació de la proteïna NLRP3 de l'inflamasoma. De la mateixa manera que PERK, IRE1 α és capaç d'activar la proteïna NLRP3 del

inflammasoma incrementant l'expressió de TXNIP (Lerner i col., 2012). Sembla ser que ATF6 també està involucrat en l'activació d'NF- κ B, no obstant, no se'n coneixen els mecanismes moleculars responsables (Hotamisligil, 2010). D'altra banda, així com diferents autors van demostrar que NF- κ B podia activar-se per les tres principals proteïnes de la UPR, Garg i col. (2012) van proposar que només la proteïna IRE1 α participava en l'activació del FT AP-1. Així, IRE1 α mitjançant la fosforilació de JNK pot conduir a la fosforilació i conseqüent activació d'AP-1 (Davis, 2000) (**Figura 16**).

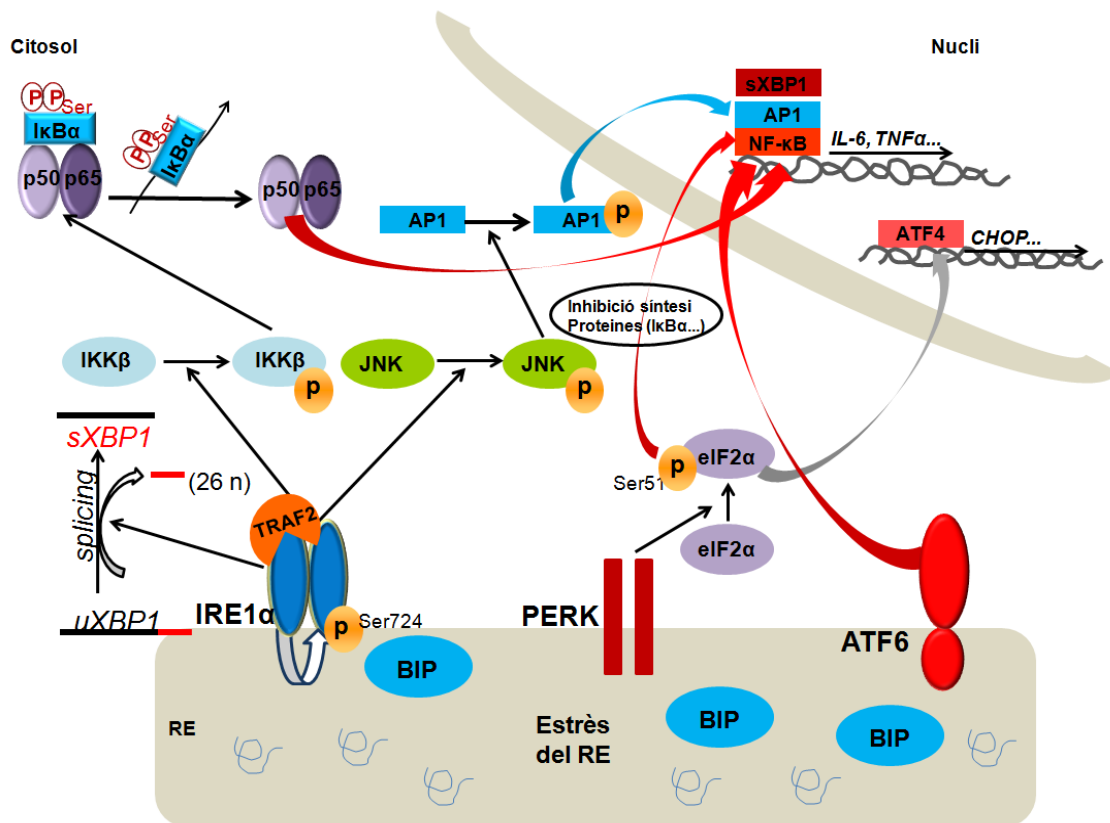


Figura 16. Esquema de les proteïnes involucrades en els processos inflamatoris activats per l'estrès del RE. Les tres proteïnes transmembrana activades per la UPR en resposta a l'estrès del RE (IRE1 α , PERK, ATF6) condueixen a l'activació d'NF- κ B. En canvi, només IRE1 α és la responsable de l'activació d'AP-1. sXBP1, activat per la proteïna IRE1 α , també actua com a FT de gens proinflamatoris.

Alguns autors apunten a l'acumulació intracel·lular de ROS secundària a l'activació de l'estrès del RE com a responsable de l'aparició de processos inflamatoris (Zhang i Kaufman, 2008). En aquestes condicions, la UPR pot activar mecanismes antioxidants a través de PERK, responsable d'incrementar la síntesi dels FT ATF4 i NRF2 (*Nuclear factor-erythroid-derived 2 (NF-E2)-related factor 2*) (Cullinan i col., 2003; Harding i col., 2003). Per tant, NRF2 transloca al nucli en resposta a l'activació

de PERK actuant com a FT de gens que codifiquen per enzims antioxidants (Mathers i col., 2004; Zhang, 2006), i juntament amb l'ATF4 són responsables d'incrementar els nivells intracel·lulars de glutatió, principal agent antioxidant en l'organisme (Cullinan i col., 2003). Harding i col. (2003) i Cullinan i Diehl (2004) van demostrar el potencial antioxidant de la via que involucra PERK, atès que l'estrès del RE secundari a l'addició de tunicamicina (inductor d'estrès del RE que inhibeix processos de glicosilació) va induir més toxicitat per acumulació de ROS en cèl·lules deficientes en *PERK* que no pas en cèl·lules que no presentaven aquesta deficiència (**Figura 16**).

Zhang i Kaufman (2008) van suggerir que, a més de l'estat oxidatiu de la cèl·lula, la concentració de calci en el lumen del RE podia afectar de manera important al plegament de les proteïnes i a la funcionalitat de les xaperones presents en aquest orgànel. Així doncs, Park i col. (2010a) van proposar que ionòfors com la calcimicina, que alteren l'homeòstasi del calci en la cèl·lula, condueixen a estrès del RE. Cal destacar que la concentració de calci en el RE és molt superior que en el citosol cel·lular (Berridge i col., 2003) i, a més, aquesta entrada de calci al RE té lloc per un mecanisme dependent d'ATP. De fet, la taspigargina, potent inductor d'estrès del RE utilitzat en recerca, actua inhibint l'ATPasa SERCA (*Sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase*) de manera que queda bloquejada l'entrada de calci al lumen del RE conduint a alteracions en la funcionalitat d'aquest orgànel (Lytton i col., 1991). Park i col. (2010a) van demostrar que els nivells proteics i d'mRNA de SERCA en ratolins obesos es trobaven reduïts i, a més, van observar que en restaurar els nivells d'aquesta ATPasa en el fetge de ratolins obesos i diabètics es reduïa l'estrès del RE alhora que s'incrementava la tolerància a la glucosa i disminuïa la glucèmia. Tanmateix, Deniaud i col. (2008) van observar que l'acumulació de proteïnes malplegades al lumen del RE podia afavorir la sortida de calci d'aquest orgànel, alterant l'homeòstasi del mateix. Sembla ser que el calci alliberat del RE es concentra a la matriu mitocondrial causant la despolarització de la membrana mitocondrial interna i la conseqüent alteració del transport d'electrons en aquest orgànel, conduint així a la formació de ROS (Görlach i col., 2006). La generació de ROS per part de la mitocòndria pot incrementar l'alliberament de calci del RE alterant així l'homeòstasi d'aquest orgànel i afavorint l'acumulació de proteïnes malplegades en el lumen. Considerant tot això, Zhang i Kaufman (2008) van proposar que la reducció en els nivells de calci del RE, l'acumulació de proteïnes malplegades en el lumen d'aquest orgànel i la producció de ROS, actuen conjuntament per a activar proteïnes involucrades en processos inflamatoris, tals com la JNK i NF- κ B (Malhotra i Kaufman, 2007).

Tal com s'ha comentat prèviament, hi ha estudis que assenyalen què els processos inflamatoris poden conduir a l'activació d'estrès del RE (Xue i col., 2005). Ara bé, tot i que no se'n coneixen els mecanismes moleculars, varis autors proposen que les citocines proinflamatòries poden afectar al correcte plegament de les proteïnes del RE conduint a l'alliberació de calci d'aquest orgàdul i a l'acumulació de ROS (Lin i col., 2005; Xue i col., 2005). En canvi, altres autors proposen que tant les citocines, com les alteracions metabòliques que cursen amb elevats nivells de colesterol, AGL i glucosa en l'organisme, podrien ser possibles inductors de l'estrès del RE així com de processos inflamatoris (Maedler i col., 2002; Feng i col., 2003; Kharroubi i col., 2004), no obstant, fins aleshores no se'n coneixen amb exactitud els mecanismes moleculars responsables (Zhang i Kaufman, 2008) (**Figura 17**).

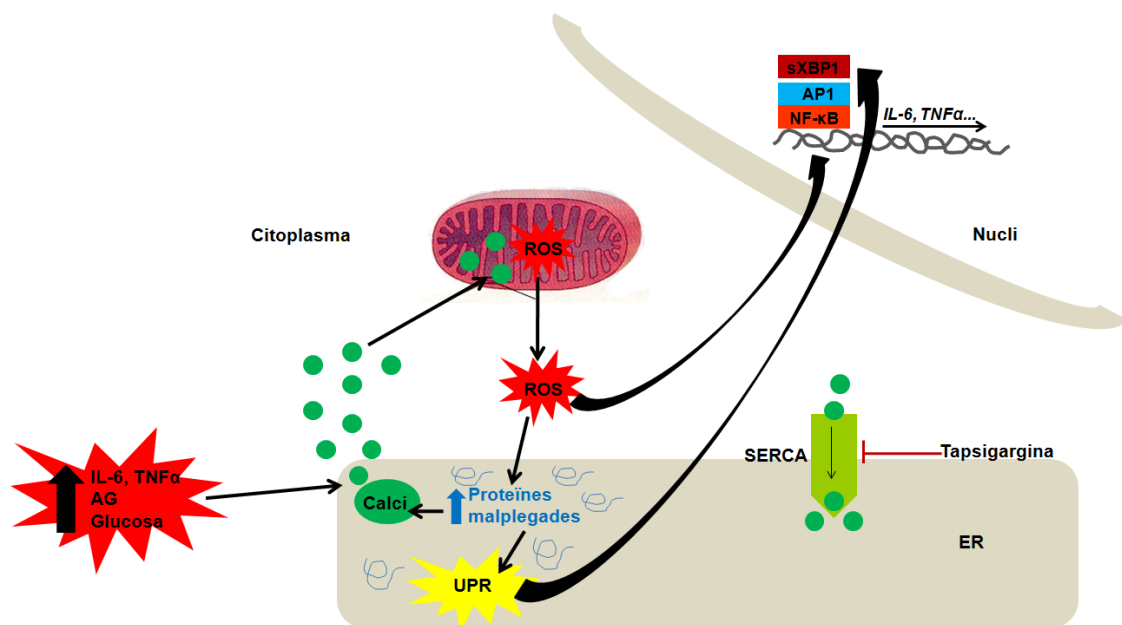


Figura 17. Alteracions en l'homeòstasi del calci del RE condueixen a l'activació d'estrès del RE així com a processos inflamatoris, mitjançant mecanismes que involucren la producció de ROS i la conseqüent acumulació de proteïnes malplegades en el lumen del RE.

5.1.2 TLR i inflamació

Alguns investigadors proposen que l'estrès del RE pot donar lloc a processos inflamatoris i alteracions metabòliques a través de l'activació dels TLR en casos d'obesitat, possiblement degut a l'excés d'AGL (Shi i col., 2006; Könnner i Brüning, 2011). En aquest sentit, ha estat descrit que els TLR2 i TLR4 activen la via IRE1 α -XBP1 en macròfags, la qual condueix a un increment en l'expressió de citocines proinflamatòries per part d'sXBP1, tals com la *IL-6* i el *TNF α* (Martinon i col., 2010), les quals tal com s'ha comentat en capítols anteriors, s'han relacionat estretament amb

l'aparició de RI (Wellen i Hotamisligil, 2005). Martinon i col. (2010) van adonar-se que en estimular macròfags murins amb un lipopèptid lligand del TLR2, o bé amb lipopolisacàrids (LPS, *Lipopolysaccharide*) lligands dels TLR4, s'activava la via que involucrava la proteïna IRE1 α -XBP1 i, sorprenentment, aquests autors no van observar activació de les proteïnes PERK i ATF6. De fet, quan aquests macròfags es van preincubar amb LPS prèviament a l'addició de tunicamicina, s'observava una reducció en l'activació de les proteïnes PERK i ATF6 respecte els macròfags incubats només amb tunicamicina. Aquests resultats suggerien que IRE1 α es podia activar de manera selectiva per part dels TLR2 i TLR4 alhora que aquesta via semblava ser la responsable d'inhibir les proteïnes PERK i ATF6.

Per tal d'activar-se correctament, la via TLR-IRE1 α requereix de les proteïnes adaptadores TRAF6 i MyD88, així com de l'activitat de la NADPH oxidasa NOX2. No obstant, cal destacar que aquesta via no requereix de la proteïna JNK ni del FT NF- κ B per tal de conduir a processos inflamatoris (Grandvaux i col., 2007; Engel i Barton, 2010). Curiosament, Martinon i col. (2010) van observar en els seus experiments que l'activació d'sXBP1 no era suficient per donar lloc a la formació de citocines proinflamatòries, per tant, van suggerir que sXBP1 actuava en sinèrgia amb la via dels TLR per tal d'incrementar l'expressió d'*Il-6* i *Tnf α* . Així, aquests autors proposen que la via IRE1 α -XBP1 activada pels TLR no té com objectiu incrementar la transcripció dels gens diana de la UPR encarregats de restablir l'homeòstasi al RE, sinó que té com objectiu l'activació de vies inflamatòries. A més, sembla ser que la UPR juntament amb la via TLR-IRE1 α actuen sinèrgicament a l'hora d'activar la resposta inflamatòria (Engel i Barton, 2010) (**Figura 18**).

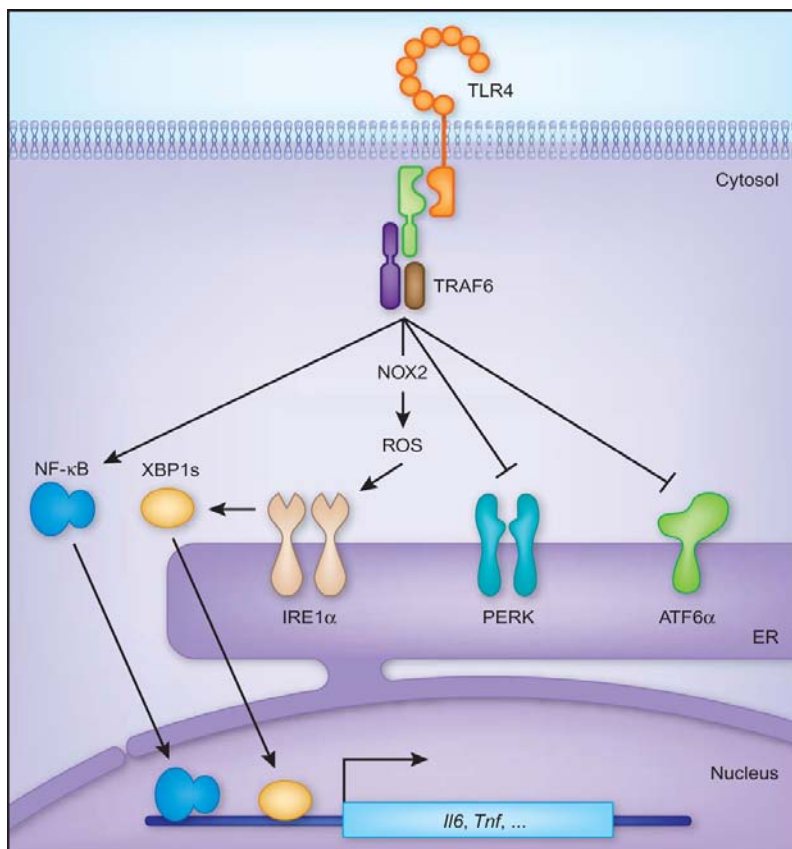


Figura 18. Modulació selectiva dels sensors de la UPR a través dels TLR. L'estimulació del TLR4 en macròfags condueix a l'activació d'IRE1 α , així com a la inhibició de PERK i ATF6. L'activació d'NF- κ B per part del TLR4, així com l'sXBP1 format a partir de l'IRE1 α , poden translocar al nucli i incrementar la transcripció de gens proinflamatoris tals com la *IL-6* i el *TNF α* (Engel i Barton, 2010).

5.2. Estrès del RE i RI

Tal com s'ha comentat en capítols anteriors, l'estrès del RE està involucrat en l'activació de processos inflamatoris crònics de baixa intensitat, els quals juguen un paper molt important a l'hora d'inhibir la via de senyalització de la insulina (Hotamisligil, 2010). De fet, Flamment i col. (2012) van proposar que l'estrès del RE pot actuar directament inhibint la via de senyalització de la insulina a través de la UPR, activant processos inflamatoris, així com promovent l'acumulació lipídica a través de l'activació de FT lipogènics, tals com l'SREBP-1c i l'sXBP1.

Atès que les vies moleculars activades durant l'estrès del RE poden donar lloc a RI (Aguirre i col., 2000; Hirosumi i col., 2002; Ozcan i col., 2004), Gregor i Hotamisligil (2007) van proposar també l'existència d'un cercle viciós atès que hi ha estudis que recolzen que l'estrès del RE és capaç de donar lloc a RI, així com altres investigadors apunten que estats d'hiperglucèmia i hiperlipidèmia poden conduir a estrès del RE. Així, mentre que Aguirre i col. (2000) van observar que l'activació de la

via IRE1 α -JNK inhibia la via de senyalització de la insulina mitjançant la fosforilació d'IRS1^{Ser307}, Robertson i col. (2004) van demostrar que la hiperglicèmia en cèl·lules β conduïa a un increment en els nivells de ROS, els quals s'han relacionat estretament amb l'aparició d'estrès del RE (Xue i col., 2005). Ozcan i col. (2006) van confirmar la importància de l'estrès del RE a l'hora de donar lloc a RI ja que van demostrar que la reducció d'aquest mitjançant xaperones químiques tals com l'àcid 4-fenilbutíric (PBA, *4-Phenyl butyric acid*) i l'àcid tauroursodesoxicòlic (TUDCA, *Taurine-ursodeoxycholic acid*) millorava la RI en ratolins que presentaven obesitat. Aquests resultats van ser recolzats per Nakatani i col. (2005), els quals van demostrar que la deficiència d'*ORP150* reduïa la sensibilitat a la insulina mitjançant una disminució en la fosforilació d'IRS1 en residus de tirosina. A més, varis autors van observar que el palmitat conduïa a estrès del RE i RI, i que l'addició de xaperones evitava aquests efectes (Wang i col., 2006; Gu i col., 2010; Pfaffenbach i col., 2010).

IRE1 α -XBP1

Estudis recents han demostrat que ratolins deficients en XBP1 presentaven intolerància a la glucosa secundària a una reducció en la secreció d'insulina (Lee i col., 2011a). En línia amb aquests resultats, la manca d'XBP1 en ratolins alimentats amb una dieta rica en greixos conduïa també a RI (Zhou i col., 2011). De la mateixa manera, Ozcan i col. (2004) assenyalen que la deficiència d'sXBP1 afavoria el desenvolupament d'estrès del RE, hiperactivació de la proteïna JNK i també RI en ratolins. Per tant, alteracions en la via de senyalització de la insulina es poden relacionar directament amb l'estrès del RE. Cal destacar també que Park i col. (2010b) van observar que en ratolins que presentaven obesitat, l'sXBP1 no es podia unir a la subunitat reguladora p85 del complex PI3K en fetge, de manera que no era capaç de translocar al nucli cel·lular i restablir l'homeòstasi del RE. Estudis posteriors apunten que l'sXBP1 podria regular l'homeòstasi de la glucosa mitjançant la interacció amb FOXO1 (Zhou i col., 2011). En aquests experiments, Zhou i col. (2011) van suggerir que l'sXBP1 podia interaccionar amb FOXO1 en cèl·lules MEF (*Mouse embryonic fibroblasts*) afavorint la seva degradació al proteosoma, fet que confirmava els efectes antigluconeogènics de l'sXBP1.

A partir d'aquestes dades, Bailly-Maitre i col. (2010) van proposar que la via IRE1 α -XBP1 tenia un paper clau en la regulació del metabolisme glucídic ja que, en suprimir l'activitat hepàtica d'IRE1 α mitjançant la sobreexpressió de BI-1 tant en ratolins obesos com en ratolins diabètics, es va observar una reducció de la taxa de gluconeogènesi i una millora de la tolerància a la glucosa. Cal destacar que estudis

recents suggereixen que les proteïnes IRE1 α i sXBP1 poden modular vies metabòliques directament regulant l'expressió de gens involucrats en el metabolisme o bé indirectament mitjançant l'activació de vies inflamatòries (Hotamisligil, 2010). Tal com s'ha comentat en el capítol anterior, IRE1 α pot activar les cinases JNK i IKK que al seu torn poden fosforilar IRS1 en Ser³⁰⁷ inhibint així la via de senyalització de la insulina (Flamment i col., 2012). A més, IRE1 α pot activar els FTs AP-1, NF- κ B i sXBP1, responsables també de la transcripció de citocines proinflamatòries estretament relacionades amb l'aparició de RI (Hotamisligil, 2010).

PERK-eIF2 α

De la mateixa manera que la via IRE1 α -XBP1, PERK-eIF2 α també participa en l'activació de processos inflamatoris responsables de l'aparició de RI, principalment mitjançant l'activació del FT NF- κ B (Hotamisligil, 2010). A més, alguns autors destaquen la importància de la via que involucra PERK a l'hora de regular la funcionalitat de les cèl·lules β pancreàtiques. Així, estudis realitzats per Harding i col. (2001) van demostrar que ratolins deficients en *Perk* presentaven hiperglucèmia secundària a la pèrdua dels illots pancreàtics. La importància de PERK en cèl·lules pancreàtiques també ha estat demostrada en humans, fins el punt que mutacions en el gen que codifica per aquesta proteïna es tradueixen en l'aparició del síndrome Wolcott-Rallison, sent la diabetis un dels símptomes presents en aquesta patologia (Delépine i col., 2000).

ATF6

Tal com s'ha comentat prèviament, ATF6 també és capaç d'activar el FT NF- κ B, conduint a processos inflamatoris i de RI. Així doncs, estudis recents s'han centrat en estudiar la relació entre el FT ATF6 i l'homeòstasi glucídica en l'organisme, de manera que Wang i col. (2009) van demostrar que aquest era capaç de reduir la gluconeogènesi, així com la glucèmia en ratolins. Estudis posteriors també van destacar la importància d'ATF6 en el procés de lipogènesi i gluconeogènesi en observar que ratolins deficients en *Atf6* presentaven un increment en els nivells d'mRNA d'importants FT implicats en la transcripció d'enzims lipogènics (*Ppar γ* i *Srebp-1c*), així com de gens gluconeogènics (*G6P*) (Usui i col., 2012). Per tant, la falta d'ATF6 en aquests ratolins conduïa a l'acumulació lipídica en fetge malgrat que sorprenentment els nivells de TG circulants estaven reduïts, fet que aquests autors van relacionar amb la major sensibilitat a la insulina en aquests ratolins deficients en *ATF6*.

Tal com s'ha comentat prèviament, en cas de no poder restablir l'homeòstasi en el RE les vies que involucren PERK i ATF6 són responsables d'induir processos d'apoptosi, incrementant la transcripció de *CHOP* (Zhang i Kaufman, 2008). Oyadomari i col. (2002) van demostrar que ratolins deficients en *Chop* eren capaços de mantenir millor l'homeòstasi de la glucosa respecte ratolins no deficients en aquest gen, fet que es podria atribuir a la menor pèrdua de cèl·lules β pancreàtiques en els ratolins que presentaven la deficiència genètica. Cal destacar que, Flamment i col. (2012) van proposar que TRB3, responsable d'inhibir la via de senyalització de la insulina, s'activava per la via PERK-ATF4-CHOP (Ohoka i col., 2005). A més, Oberkofler i col. (2010) apuntaven que en pacients obesos els nivells d'expressió de TRB3 es relacionaven estretament amb els nivells d'expressió de gens involucrats en la gluconeogènesi.

5.3 Estrès del RE i AG

Alguns autors assenyalen a l'estrès del RE com a mediador de la RI induïda per palmitat en múscul esquelètic (Peng i col., 2011). De fet, diferents estudis han demostrat que l'addició de palmitat a miotubs humans (Hage Hassan i col., 2012; Peter i col., 2009), C2C12 (Hage Hassan i col., 2012; Rieusset i col., 2012) i L6 (Peng i col., 2011), conduïa a l'aparició d'estrès del RE. En línia amb aquests resultats, ratolins alimentats amb una dieta rica en greixos també van desenvolupar estrès del RE en múscul esquelètic (Deldicque i col., 2010). Atès que l'acumulació ectòpica d'AG és la principal causa de RI en múscul esquelètic, alguns investigadors han centrat els seus experiments en esbrinar si l'estrès del RE induït pel palmitat juga un paper important en l'aparició de RI en múscul esquelètic (Flamment i col., 2012). Per exemple, Peng i col. (2011) van observar que el palmitat, s'acumulava en forma de DAG i fosfolípids en múscul esquelètic produint alteracions morfològiques del RE, responsables de l'aparició d'estrès del RE. Aquests autors van demostrar que l'addició de PBA a cèl·lules C2C12 incubades amb palmitat restablia els nivells de fosforilació d'AKT, demostrant que l'estrès del RE era el responsable de la RI produïda pel palmitat en aquest model cel·lular. Ara bé, aquests autors van demostrar que l'oleat no només no va donar lloc a estrès del RE en cèl·lules de múscul esquelètic, sinó que va ser capaç d'evitar els efectes produïts pel palmitat afavorint l'acumulació dels AG en forma de TG, els quals ja s'ha comentat prèviament que no condueixen a l'aparició de RI en múscul esquelètic (Coll i col., 2008). En capítols anteriors s'ha parlat de què l'acumulació de palmitat en forma de ceramides podria ser responsable de l'aparició de RI en múscul esquelètic (Schmitz-Peiffer i col., 1999; Pickersgill i col., 2007), però

estudis realitzats per Wei i col. (2006) van descartar les ceramides com a responsables de l'estrès del RE produït pel palmitat en cèl·lules hepàtiques.

Tenint en compte el diferent paper dels AG saturats i insaturats sobre l'estrès del RE, Ariyama i col. (2010) van proposar que en cèl·lules HeLa la reducció en l'enzim SCD1 empitjorava l'estrès del RE produït pel palmitat, mentre que l'oleat evitava l'activació de la UPR secundària a la manca d'*SCD1* en aquest model cel·lular. En línia amb aquests resultats, la sobreexpressió d'*SCD1* en miotubs humans va evitar l'increment en els nivells d'mRNA de citocines proinflamatòries com la *IL8* així com els nivells d'expressió gènica de marcadors d'estrès del RE com l'*ATF3*, el *CHOP* i l'*sXBP1* induïts pel palmitat (Peter i col., 2009).

Recentment estudis realitzats per Liu i Ntambi (2009) han proposat que la proteïna transportadora d'AG en adipòcits (aP2, *Adipocyte fatty acid-binding protein*) podria estar relacionada amb alteracions metabòliques tals com la DM2. Aquesta proteïna s'expressa principalment en macròfags i adipòcits i s'encarrega del transport citosòlic de lípids. Erbay i col. (2009) van demostrar que la proteïna aP2 era responsable de l'estrès del RE produït pel palmitat en macròfags, ja que aquest AG no va poder induir estrès del RE en macròfags deficients en aquesta proteïna. Aquests autors van destacar novament el paper de l'enzim SCD1 a l'hora d'evitar l'estrès del RE ja que la manca d'aP2 en macròfags va conduir a un increment de l'expressió gènica d'*SCD1* i a una reducció de l'estrès del RE produït pel palmitat, destacant l'important paper de la proteïna aP2 en l'estrès del RE induït pels AG en macròfags.

Considerant que alteracions de l'homeòstasi del calci poden conduir a l'aparició d'estrès del RE, alguns autors s'han centrat en investigar si els AG saturats afectaven aquests processos. Gwiazda i col. (2009) van demostrar que una reducció en els dipòsits de calci del RE causada pel palmitat en cèl·lules β pancreàtiques, donava lloc a estrès del RE i en última instància a la mort cel·lular, suggerint que els AG saturats poden produir alteracions en l'homeòstasi del calci responsables de la patogènesi de la DM2. Tanmateix, Wei i col. (2009) van observar que l'oleat evitava la reducció en els dipòsits de calci cel·lulars, així com la inducció de marcadors d'estrès del RE produïda pel palmitat en cèl·lules hepàtiques. Ara bé, en aquests estudis la reducció del calci citosòlic mitjançant el BAPTA-AM, agent quelant del calci, no va reduir els nivells d'expressió gènica de marcadors d'estrès del RE incrementats pel palmitat en aquest model cel·lular.

5.4 Estrès del RE, AMPK i ERK

Estudis realitzats per Dong i col. (2010a) van demostrar que la cinasa AMPK reduïa l'estrès del RE en cèl·lules endotelials mantenint l'homeòstasi intracel·lular de calci. Altres estudis també assenyalen que l'AMPK juga un paper important inhibint l'estrès del RE (Terai i col., 2005; Lee i col., 2012; Lu i col., 2012b), i inclús alguns autors proposen que la inhibició de l'estrès del RE per part d'aquesta cinasa podria ser responsable d'evitar la RI en miotubs L6 (Jeong i col., 2013). Wang i col. (2011b) van confirmar els efectes beneficiosos de l'AMPK evitant l'estrès del RE en ratolins alimentats amb una dieta rica en greixos. Aquests autors assenyalen a l'AMPK com a regulador positiu de l'expressió de la xaperona *ORP150* mitjançant l'activació de SIRT1 i la consegüent desacetilació de FOXO1 a nivell hepàtic, ja que aquest FT quan es troba desacetilat incrementa la transcripció dels seus gens diana tals com *l'ORP150*.

Darling i Cook (2014) van suggerir que la UPR activada per l'estrès del RE es relacionava estretament amb l'activació de les MAPK. Tanmateix, estudis realitzats per Hwang i col. (2013) van proposar que la inhibició de la cinasa ERK activava les vies de senyalització que involucraven les proteïnes AMPK i AKT i, a més, evitava la RI induïda per l'estrès del RE en miotubs L6. Aquests estudis van suggerir que la proteïna ERK jugava un paper important en la regulació de la via de senyalització de la insulina en cèl·lules musculars en condicions d'estrès del RE.

A més, cal destacar que la cinasa JNK es pot activar mitjançant la via IRE1-TRAF2-ASK1 (Kim i col., 2001; Nishitoh i col., 2002) i donar lloc a processos inflamatoris tal com s'ha comentat prèviament (Hotamisligil, 2010), o bé induïr apoptosi. Igualment, Timmins i col. (2009) van demostrar que l'estrès del RE en macròfags induïa l'alliberació de calci del lumen d'aquest orgànul conduint a l'activació de la CaMKII (*Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II*), cinasa dependent de calci responsable de l'activació de la proteïna JNK. D'altra banda, cal destacar que IRE1 α en resposta a l'estrès del RE pot activar ERK1/2, responsable de promoure la supervivència cel·lular en situacions d'estrès del RE (Darling i Cook, 2014) (**Figura 19**).

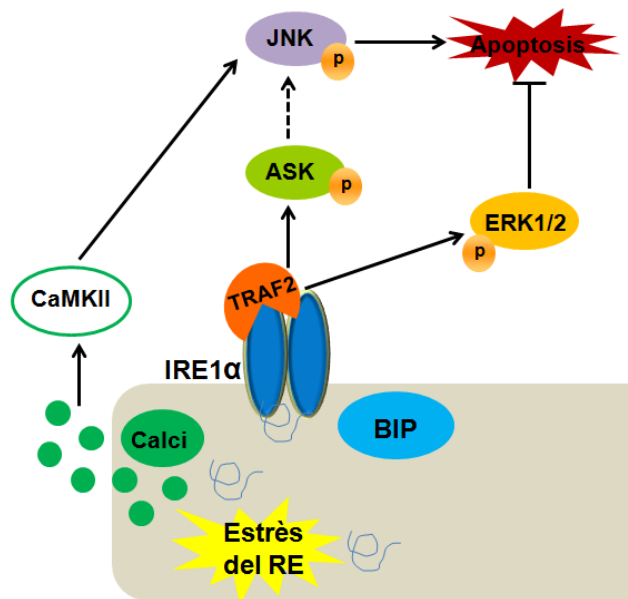


Figura 19. Activació de les cinases JNK i ERK1/2 en resposta a l'estrès del RE. Mentre que JNK s'ha relacionat amb l'activació de vies apoptòtiques, ERK1/2 sembla ser que promou la supervivència cel·lular.

5.5 Estrès del RE i PPAR β/δ

Tal com s'ha comentat prèviament, la metformina és un fàrmac àmpliament utilitzat en la pràctica clínica per al tractament de la DM2. Tot i que Brunmair i col. (2004) proposen que aquest fàrmac exerceix els seus efectes antidiabètics mitjançant l'activació de l'AMPK, estudis posteriors van proposar que el FT PPAR β/δ també podria participar en aquest procés (Cheang i col., 2014). Tenint en compte que Narkar i col. (2008) van demostrar que l'AMPK formava un complex transcripcional amb PPAR β/δ potenciant l'activació d'aquest FT, Cheang i col. (2014) van proposar que la metformina activava el complex AMPK/PPAR β/δ , evitant així l'estrès del RE i l'estrès oxidatiu en cèl·lules endotelials.

Així doncs, estudis recents suggereixen que l'activació de PPAR β/δ podria inhibir l'estrès del RE en diferents models cel·lulars. De fet, Cao i col. (2012) van ser els primers investigadors en demostrar que l'activació de PPAR β/δ inhibia l'estrès del RE induït per palmitat en cèl·lula β , fet que recolzava estudis previs que proposaven que aquest FT podria ser una diana terapèutica per al tractament de la DM2 (Coll i col., 2010a). A més, estudis posteriors van confirmar el paper d'aquest FT sobre l'estrès del RE en demostrar que l'activació de PPAR β/δ mitjançant el GW501516 va inhibir les vies moleculars que involucraven l'ERK1/2, així com el FT NF- κ B en l'aorta de ratolins alimentats amb una dieta rica en greixos. D'aquesta manera, l'administració de GW501516 va ser capaç de reduir processos inflamatoris, millorar la RI així com evitar

l'estrès del RE en aquests ratolins (Bojic i col., 2014). Malgrat aquests estudis, es desconeix quin és el mecanisme pel qual els activadors de PPAR β/δ poden prevenir l'estrès del RE.

5.6 Estrès del RE com a diana terapèutica per al tractament de la DM2

En capítols anteriors s'han esmentat nombrosos estudis que apunten a l'estrès del RE com a diana terapèutica per al tractament de la DM2. Estudis realitzats per Kars i col. (2010) van observar que l'administració de TUDCA a pacients que presentaven obesitat i RI millorava la sensibilitat a la insulina en múscul i fetge, suggerint que la inhibició de l'estrès del RE mitjançant l'administració de TUDCA podria ser una estratègia terapèutica per al tractament de la RI en pacients diabètics. En línia amb aquests resultats, estudis posteriors van demostrar que la inhibició de l'estrès del RE mitjançant l'administració de PBA evitava la RI i restablia la funcionalitat de la cèl·lula β en pacients als que se'ls havia administrat lípids per via intravenosa (Xiao i col., 2011).

Cal destacar que actualment s'està avaluant l'eficàcia clínica dels inhibidors de l'estrès del RE TUDCA i PBA per al tractament de la diabetis i la RI. En aquests estudis es vol confirmar si la inhibició de l'estrès del RE és capaç de restablir la sensibilitat a la insulina, així com millorar el metabolisme lipídic a nivell hepàtic en pacients que presenten obesitat. A més, tal com s'ha comentat prèviament, la metformina, fàrmac de gran rellevància per al tractament de la DM2, és capaç d'inhibir l'estrès del RE en cèl·lules endotelials (Cheang i col., 2014), destacant novament el potencial de l'estrès del RE com a diana terapèutica per al tractament de la DM2.

Cal destacar que Hotamisligil (2010) proposa que la RI, atès que la insulina és una hormona anabòlica, podria alleujar l'estrès del RE inhibint la síntesi de proteïnes. Per tant, podria considerar-se que la RI apareix degut a l'activació de les vies de la UPR secundàries a l'estrès del RE per tal de reduir la carga proteica en aquest orgànul i restablir-ne l'homeòstasi. Aquest autor proposa que si la seva hipòtesi és correcta, s'hauria d'anar en compte a l'hora de dissenyar estratègies terapèutiques que millorin la RI sense restablir l'homeòstasi del RE, ja que aquest fet incrementaria la carga proteica en el lumen d'aquest orgànul agreujant aquesta situació d'estrès que al seu torn conduiria novament a l'aparició de RI.

OBJECTIUS

Des de fa dècades es coneix que existeix una estreta relació entre estats d'obesitat i la RI, fins al punt que més del 80% de les persones que pateixen DM2 presenten obesitat (Boden i Chen, 1995). Estudis recents assenyalen a l'elevada taxa lipolítica del teixit adipós visceral i a l'acumulació ectòpica de lípids provocada per la ingesta excessiva de nutrients, com a responsables de la RI en casos d'obesitat (Tchernof i Després, 2013). A nivell cel·lular, ha estat descrit, que la RI induïda per lípids en múscul esquelètic humà és secundària a l'acumulació dels AG en forma de DAG i conseqüent activació de vies inflamatòries (Itani i col., 2002). Ara bé, no tots els AG contribueixen de la mateixa manera a l'activació de les vies inflamatòries que condueixen a RI. Així, mentre que els AG saturats com el palmitat les activen, els monoinsaturats com l'oleat no només no les activen, sinó que exerceixen efectes antiinflamatoris i antidiabètics.

Recentment, l'estrès del RE s'ha proposat com a responsable de l'activació de les vies inflamatòries que precedeixen la RI (Garg i col., 2012). Així doncs, considerant la diferent contribució dels AG saturats i monoinsaturats sobre l'estrès del RE en múscul esquelètic (Peng i col., 2011), el primer objectiu d'aquesta tesi doctoral ha estat:

1. Aprofundir en l'estudi de l'estrès del RE induït per un àcid gras saturat com el palmitat per tal d'elucidar nous mecanismes moleculars que expliquin els efectes antiinflamatoris i antidiabètics de l'oleat en cèl·lules musculars esquelètiques.

D'altra banda, estudis previs realitzats en el nostre laboratori han demostrat que l'activació de PPAR β/δ mitjançant el GW501516, evita la inflamació i la RI en múscul esquelètic (Coll i col., 2010a). A més, alguns autors apunten que l'activació d'aquest FT redueix l'estrès del RE en cèl·lules β pancreàtiques (Cao i col., 2012) i en fetge (Ramirez i col., 2013), encara que es desconeixen els mecanismes responsables pels quals l'activació de PPAR β/δ redueix l'estrès del RE. Considerant aquests fets i, a més, tenint en compte que l'estrès del RE precedeix processos inflamatoris i de RI (Garg i col., 2012), els segon objectiu d'aquesta tesi doctoral ha estat:

2. Avaluar si l'activació de PPAR β/δ pot evitar la inflamació i la RI induïda per l'estrès del RE en cèl·lules musculars esquelètiques i, aprofundir en els mecanismes moleculars responsables d'aquest procés.

RESULTATS

***Oleate prevents saturated-fatty-acid-induced
ER stress,
inflammation and insulin resistance in
skeletal muscle
cells through an AMPK-dependent
mechanism***

Laia Salvadó, Teresa Coll, Anna Maria Gómez-Foix, Emilio Salmerón,
Emma Barroso, Xavier Palomer i Manuel Vázquez-Carrera

Diabetologia (2013) 56:1372–1382

L'elevada taxa lipolítica del teixit adipós visceral en estats d'obesitat pot superar la capacitat oxidativa de l'organisme donant lloc a un augment d'AGL en plasma que al seu torn es poden acumular en el múscul esquelètic en forma de DAG, responsable de l'activació de les vies inflamatòries que precedeixen la RI. Ara bé, no tots els AG contribueixen de la mateixa manera a l'aparició d'aquests estats patològics: mentre que els AG saturats com el palmitat activen les vies inflamatòries que condueixen a RI, els AG monoinsaturats com l'oleat no donen lloc a aquests processos. Ha estat descrit que el palmitat s'acumula en el múscul esquelètic en forma de DAG conduint així a l'activació de la PKC θ i del FT NF- κ B responsable de regular l'expressió de la *IL-6*, citocina estretament relacionada amb la RI. Ara bé, l'oleat no només no produeix aquests efectes, sinó que es capaç d'evitar la inflamació i RI produïda per l'AG saturat promovent la β -oxidació mitocondrial i l'acumulació dels AG en forma de TG.

Recentment, diferents autors apunten a l'estrès del RE com a mecanisme responsable de l'aparició de processos inflamatoris i de RI induïts pels AG saturats. Així doncs, l'acumulació de proteïnes malplegades en el lumen del RE activa unes vies moleculars conegudes com UPR a fi de restablir l'homeòstasi en aquest orgànul i, en última instància, en cas de no poder-la restablir induir la mort cel·lular per apoptosi. Aquesta UPR s'ha relacionat estretament amb l'activació de vies inflamatòries i amb alteracions en la via de senyalització de la insulina, fins al punt que estudis recents assenyalen que l'acumulació del palmitat en forma de DAG en miotubs C2C12 condueix a l'aparició d'estrès del RE responsable de la RI induïda per l'AG saturat en aquest model cel·lular.

L'**objectiu** d'aquest treball ha estat estudiar si l'oleat es capaç d'exercir els seus efectes antiinflamatoris i antidiabètics mitjançant mecanismes que modulin l'estrès del RE en cèl·lules musculars esquelètiques. A més, tenint en compte que l'AMPK inhibeix l'estrès del RE, en aquest estudi es va voler elucidar si l'oleat, mitjançant l'activació de l'AMPK, evitava l'estrès del RE responsable de l'aparició de la inflamació i RI induïda pel palmitat.

Els **resultats** obtinguts mostren que l'oleat evita l'estrès del RE induït pel palmitat en miotubs murins C2C12 i humans LHCN-M2, tal com ho demostra el fet de que va ser capaç de reduir els nivells d'expressió gènica d'*sXbp1*, *Atf3*, *Chop*, *Hsp70* i *Bip* incrementats pel palmitat, així com els nivells proteics de BIP i de fosforilació d'IRE1 α . Els efectes de l'oleat sobre l'estrès del RE, així com els seus efectes antiinflamatoris i antidiabètics semblen involucrar la cinasa AMPK, donat que la

inhibició farmacològica i molecular d'aquesta proteïna, va revertir els efectes de l'oleat sobre els nivells d'expressió gènica dels marcadors d'estrès del RE, d'inflamació i de RI. Així, el compost C va evitar la reducció produïda per l'oleat en els nivells d'expressió gènica d'*sXbp1*, *Atf3*, i *Chop*, així com els nivells d'expressió i secreció d'IL-6 i l'activació del FT NF- κ B. El compost C també va revertir els efectes antidiabètics de l'oleat fins el punt que va evitar l'increment en els nivells de fosforilació de la proteïna AKT, així com l'augment en la captació de glucosa produït per l'oleat en miotubs C2C12. Tanmateix, la incubació de l'AG saturat i el monoinsaturat amb un plasmidi mutant de la proteïna AMPK, que desplaça l'AMPK endògena, va evitar la reducció en els nivells de fosforilació d'IRE1 α produïda per l'oleat, així com l'increment en els nivells de la proteïna inhibidora d'NF- κ B i en la fosforilació d'AKT. L'augment en la concentració d'AMP i l'increment en la fosforilació de l'AMPK causada per l'oleat, confirma la capacitat d'aquest AG per a activar al·lostèricament l'AMPK.

En **resum**, les dades d'aquest estudi indiquen que l'oleat evita l'estrès del RE, la inflamació i la RI produïda pel palmitat en cèl·lules musculars esquelètiques, mitjançant mecanismes que involucren l'activació de l'AMPK.

Oleate prevents saturated-fatty-acid-induced ER stress, inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells through an AMPK-dependent mechanism

L. Salvadó · T. Coll · A. M. Gómez-Foix · E. Salmerón ·
E. Barroso · X. Palomer · M. Vázquez-Carrera

Received: 7 December 2012 / Accepted: 28 January 2013 / Published online: 5 March 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract

Aims/hypothesis Although the substitution of saturated fatty acids with oleate has been recommended in the management of type 2 diabetes mellitus, the mechanisms by which oleate improves insulin resistance in skeletal muscle cells are not completely known. Here, we examined whether oleate, through activation of AMP-activated protein kinase (AMPK), prevented palmitate-induced endoplasmic reticulum (ER) stress, which is involved in the link between lipid-induced inflammation and insulin resistance.

Methods Studies were conducted in mouse C2C12 myotubes and in the human myogenic cell line LHCN-M2. To analyse the involvement of AMPK, activators and inhibitors of this

kinase and overexpression of a dominant negative AMPK construct (K45R) were used.

Results Palmitate increased the levels of ER stress markers, whereas oleate did not. In palmitate-exposed cells incubated with a lower concentration of oleate, the effects of palmitate were prevented. The induction of ER stress markers by palmitate was prevented by the presence of the AMPK activators AICAR and A-769662. Moreover, the ability of oleate to prevent palmitate-induced ER stress and inflammation (nuclear factor-kappa B [NF- κ B] DNA-binding activity and expression and secretion of *IL6*) as well as insulin-stimulated Akt phosphorylation and 2-deoxyglucose uptake was reversed in the presence of the AMPK inhibitor compound C or by overexpression of a dominant negative AMPK construct. Finally, palmitate reduced phospho-AMPK levels, whereas this was not observed in oleate-exposed cells or in palmitate-exposed cells supplemented with oleate.

Conclusions/interpretation Overall, these findings indicate that oleate prevents ER stress, inflammation and insulin resistance in palmitate-exposed skeletal muscle cells by activating AMPK.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00125-013-2867-3) contains peer-reviewed but unedited supplementary material, which is available to authorised users.

L. Salvadó · T. Coll · E. Salmerón · E. Barroso · X. Palomer ·
M. Vázquez-Carrera (✉)
Pharmacology Unit, Department of Pharmacology and Therapeutic
Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona,
Diagonal 643,
08028 Barcelona, Spain
e-mail: mvazquezcarrera@ub.edu

L. Salvadó · T. Coll · A. M. Gómez-Foix · E. Salmerón ·
E. Barroso · X. Palomer · M. Vázquez-Carrera
Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB),
Barcelona, Spain

L. Salvadó · T. Coll · A. M. Gómez-Foix · E. Salmerón ·
E. Barroso · X. Palomer · M. Vázquez-Carrera
Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y
Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Spain
URL: www.ciberdem.org

A. M. Gómez-Foix
Department of Biochemistry and Molecular Biology,
Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Keywords AMPK · ATF3 · CHOP · ER stress · IL-6 ·
NF- κ B · Oleate · Palmitate · PPAR · XBP1

Abbreviations

ACC	Acetyl-CoA carboxylase
AMPK	AMP-activated protein kinase
ATF3	Activating transcription factor 3
ATF6	Activating transcription factor 6
CHOP	CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein
DAG	Diacylglycerol
eIF2	Eukaryotic initiation factor 2

EMSA	Electrophoretic mobility shift assay
ER	Endoplasmic reticulum
ERK	Extracellular-signal-regulated kinase
GRP78	Glucose-regulated protein 78 (BIP)
HSP70	Heat shock protein 70
I κ B	Inhibitor of κ B
IRE-1 α	Inositol-requiring 1 transmembrane kinase/endonuclease-1
LKB1	Liver kinase B1
NF- κ B	Nuclear factor- κ B
PBA	Phenylbutyric acid
PERK	Eukaryotic translation initiation factor-2 α kinase 3
PKA	Protein kinase A
PKC θ	Protein kinase C θ
PP2A	Ceramide-dependent phosphatase 2A
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
SIRT1	Silent information regulator T1
TRAF2	TNF- α -receptor-associated factor 2
UPR	Unfolded protein response

Introduction

It has long been recognised that elevated plasma NEFA cause insulin resistance in humans [1]. However, saturated and monounsaturated NEFA differ significantly in their contribution to insulin resistance [2]. It is generally accepted that saturated NEFA induce insulin resistance [2, 3], whereas monounsaturated NEFA increase insulin sensitivity in diabetic patients [4, 5] and healthy individuals [2]. The mechanisms underlying the association between elevated NEFA and insulin resistance are currently unclear but accumulating evidence points to a link between enhanced NEFA levels and activation of a chronic low-level inflammatory process [6]. Elevated saturated NEFA can induce inflammation and, thus, insulin resistance, through several mechanisms including diacylglycerol (DAG)-mediated activation of protein kinase C θ (PKC θ) [7] and activation of Toll-like receptors [8]. Both mechanisms lead to activation of the pro-inflammatory transcription factor nuclear factor-kappaB (NF- κ B), which has been linked to fatty acid-induced impairment of insulin action in skeletal muscle [9]. 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 [10] and its plasma levels are increased two- to threefold in patients with obesity and type 2 diabetes compared with lean control individuals [10].

Recently, endoplasmic reticulum (ER) stress has become a new potential mechanism involved in the association between saturated NEFA-induced inflammation and insulin

resistance [11, 12], and it is now well accepted that limitation of the former will affect the latter [12]. In fact, patients with type 2 diabetes [13] and diet-induced and genetic *ob/ob* obese mice [14] have elevated levels of key ER stress markers, and elevated levels of NEFA have been proposed to induce insulin resistance by causing ER stress [15].

In conjunction with its central role in lipid synthesis, protein folding and transportation, the ER serves as a major signal transduction organelle that integrates cellular responses to stress. The accumulation of misfolded proteins and other stresses lead to the activation of an adaptive programme by the ER, known as the unfolded protein response (UPR), to re-establish equilibrium [11]. Initiation of the canonical UPR involves activation of three key signalling proteins: inositol-requiring 1 transmembrane kinase/endonuclease-1 (IRE-1 α), activating transcription factor 6 (ATF6), and eukaryotic translation initiation factor-2 α kinase 3 (PERK). The endoribonuclease activity of IRE-1 α cleaves a 26-base-pair segment from *XBP1* mRNA, creating an alternative message that is translated into the active (or spliced) form of the transcription factor X-box binding protein 1 (XBP1) (sXBP1). ATF6 translocates to the nucleus in which it acts as a transcription factor and PERK phosphorylates and inhibits an essential initiator of translation, eukaryotic initiation factor 2 (eIF2). Together these pathways work to decrease translation and increase protein folding [16]. The three branches of the canonical UPR intersect with a variety of inflammatory and stress signalling systems, including the NF- κ B pathway [11]. Thus, phosphorylation of eIF2 α by PERK results in a general repression of mRNA translation. Since inhibitor of κ B (I κ B), which inhibits NF- κ B, has a shorter half-life than NF- κ B, UPR activation shifts the ratio of I κ B to NF- κ B, thereby releasing NF- κ B, which translocates to the nucleus and increases the expression of its target genes, such as *IL6* [12]. In addition, in response to ER stress, the cytoplasmic domain of phosphorylated IRE1 α can recruit TNF- α -receptor-associated factor 2 (TRAF2), forming a complex that interacts and activates I κ B kinase (IKK), leading to NF- κ B activation [12]. Of note, activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) exhibits multiple protective effects, including inhibition of inflammation, oxidative stress and insulin resistance and reduces the risk for developing obesity and type 2 diabetes [17]. Recently it has been reported that AMPK activation protects against hypoxic injury [18], atherosclerosis [19, 20] and lipid-induced hepatic disorders [21] by reducing ER stress.

Saturated NEFA-induced insulin resistance affects mainly skeletal muscle since this tissue accounts for most insulin-stimulated glucose use [22]. The present study was designed to investigate, in skeletal muscle cells, the cellular mechanisms by which the two most common fatty acids, the saturated fatty acid palmitate and the monounsaturated

oleate [23], exert their differential effects on ER stress and whether AMPK activation contributes to their differences in fatty acid-induced inflammation and impairment of insulin signalling. In addition, we aimed to discover whether oleate prevents the deleterious effects of palmitate. Our findings demonstrate that oleate prevents palmitate-induced ER stress in mouse and in human skeletal muscle cells through an AMPK-dependent mechanism, and contributes to the explanation of how the monounsaturated fatty acid prevents palmitate-induced inflammation and insulin resistance.

Methods

Cell culture and transfection studies Mouse C2C12 myoblasts (ATCC) were maintained and cultured as previously described [7].

For in vitro overexpression studies, cells were transfected with Lipofectamine 2000 in OPTI-MEM reduced-serum medium, following the manufacturer's recommendations (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The constructs used were pcDNA3/pAMPK α 2 K45R (Addgene plasmid 15992, Cambridge, MA, USA) and the corresponding LacZ-carrying plasmid as a control [24]. Transfection time and the DNA-to-Lipofectamine ratio for overexpression studies were set after optimisation with the corresponding LacZ-carrying plasmid and using a β -galactosidase reporter gene staining kit (Sigma-Aldrich Química, Madrid, Spain).

The human myogenic cell line LHCN-M2 [25] was grown as previously reported [26].

RNA preparation and quantitative RT-PCR The relative levels of specific mRNAs were assessed by real-time RT-PCR, as previously described [27] (see electronic supplementary material [ESM] Table 1 for primers used). *XBP1* splicing (s*XBP1*) was examined by gel electrophoresis as previously reported [28].

2-Deoxy-D-[¹⁴C]glucose uptake experiments Determination of 2-deoxy-D-[¹⁴C]glucose (2-DG) uptake was performed as reported elsewhere [7].

Immunoblotting Total proteins (30 μ g) were separated by SDS-PAGE on 10% separation gels and transferred to Immobilon polyvinylidene difluoride membranes (Millipore, Bedford, MA, USA). For IRE-1 α a phos-tag gel was used as previously described [29]. Western blot analysis was performed using antibodies against total (catalogue number 9272) and phospho-Akt (Ser473) (9271), total (2532) and phospho-AMPK (Thr172) (2531), total (3662) and phospho-ACC (Ser79) (3661), BiP/GRP78 (3183), IRE-1 α (3294) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), PP2A catalytic subunit (52F8) (sc-6110), I κ B α (sc-371), liver kinase

B1 (LKB1) (sc-5638) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and actin (A5441) (Sigma-Aldrich Química). Detection was achieved using the EZ-ECL chemiluminescence detection kit (Biological Industries, Beit Haemek, Israel). The equal loading of proteins was assessed by Ponceau S staining. The size of the proteins detected was estimated using protein molecular-mass standards (Invitrogen).

Isolation of nuclear extracts and electrophoretic mobility shift assay The isolation of nuclear extracts and electrophoretic mobility shift assay (EMSA) were performed as described elsewhere [27].

High performance liquid chromatography measurement of AMP Adenine nucleotides were separated by high performance liquid chromatography using an X-Bridge column with a 3.5 μ m outer diameter (100 \times 4.6 cm). Elution was done with 0.1 mmol/l potassium dihydrogen phosphate, pH 6, containing 4 mmol/l tetrabutylammonium hydrogen sulfate and 15% (vol./vol.) methanol. The conditions were as follows: 20 μ l sample injection, column at room temperature, flow rate of 0.6 ml/min and UV monitoring at 260 nm.

Statistical analyses Results are expressed as means \pm SD of six separate experiments. Significant differences were established by one-way ANOVA using the GraphPad Prism 4.03 program (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results

Oleate prevents palmitate-induced ER stress in mouse and human skeletal muscle cells To evaluate the differential effects of palmitate and oleate on ER stress in skeletal muscle cells we examined their effects on the expression of the ER stress markers *sXbp1*, *Atf3*, *Chop* (also known as *Ddit3*), *Hsp70* (also known as *Hspa4*) and *Grp78/Bip* (also known as *Hspa5*). Mouse C2C12 myotubes exposed to 0.5 mmol/l palmitate showed an increase in *sXbp1* mRNA levels compared with cells exposed only to BSA (Fig. 1a). The increase in the *sXbp1* mRNA levels caused by palmitate was of lower intensity than that induced by thapsigargin, a potent inducer of ER stress [30]. In contrast to palmitate, 0.5 mmol/l oleate did not increase *sXbp1* mRNA levels (Fig. 1b). Interestingly, co-incubation of cells with palmitate (0.5 mmol/l) and oleate (0.3 mmol/l) completely abolished the increase in *sXbp1* expression caused by the saturated fatty acid. Consistent with the changes in *sXbp1*, cells exposed to palmitate showed a marked increase in the expression of *Atf3*, *Chop*, *Hsp70* and *Bip* (Fig. 1c–f). These changes were not observed in cells incubated with oleate

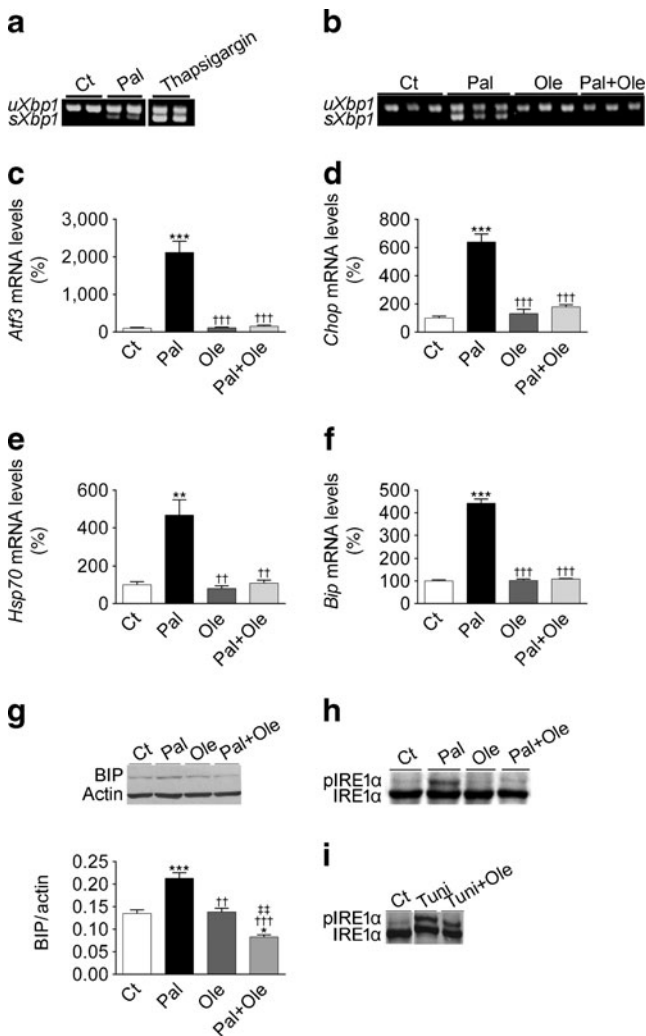


Fig. 1 Oleate prevents palmitate-induced ER stress in mouse skeletal muscle cells. C2C12 myotubes were incubated for 16 h in the presence or absence (Ct, control) of different fatty acids: 0.5 mmol/l palmitate (Pal), 0.5 mmol/l oleate (Ole) or 0.5 mmol/l palmitate supplemented with 0.3 mmol/l oleate (Pal + Ole). Indicated cells were incubated with 1 μ mol/l thapsigargin or 5 μ g/ml tunicamycin (Tuni) for 16 h. *sXbp1* (a, b), *Atf3* (c), *Chop* (d), *Hsp70* (e) and *Bip* (f) mRNA levels. The graphs represent the quantification of the *Aprt*-normalised mRNA levels, expressed as a percentage of control samples \pm SD of six independent experiments. Cell lysates were analysed by western blot using antibodies against BIP (g) and IRE1 α (h, i). Immunoblots from three separate experiments were quantified and presented in the corresponding bar graphs. *** p <0.001 and ** p <0.01 vs Ct; ††† p <0.001 and †† p <0.01 vs Pal; ‡‡ p <0.01 vs Ole

and co-incubation of palmitate-exposed cells with oleate completely blocked the effects of the saturated fatty acid. In agreement with the changes in *Bip* mRNA levels, glucose-regulated protein 78 (GRP78/BIP) protein levels were only increased in cells exposed to palmitate (Fig. 1g). Activation of IRE1 α promotes the splicing of *Xbp1*. Thus, we then evaluated whether fatty acids activated IRE1 α , by using phos-tag reagent, which selectively binds to phosphorylated amino acid residues [29]. Palmitate induced an

increase in the phosphorylated forms of IRE1 α , detected by slower migration (Fig. 1h). In contrast, this increase was observed neither in cells exposed to oleate nor in those co-incubated with palmitate and oleate. The potent pharmacological ER-stress inducer tunicamycin elicited a large increase in IRE1 α phosphorylation, which was reduced by co-incubation with oleate (Fig. 1i).

In the human myogenic cell line LHCN-M2 exposure to palmitate caused a marked increase in the expression levels of *sXBP1*, *ATF3* and *CHOP* (Fig. 2). In contrast, oleate did not and supplementation of palmitate-exposed cells with oleate completely abolished the effect of the saturated fatty acid. Overall, these findings indicate that oleate also prevents palmitate-induced ER stress in human skeletal muscle cells.

The preventive effect of oleate on palmitate-induced ER stress is peroxisome proliferator-activated receptor- α - β/δ independent Since we have previously reported that oleate prevents palmitate-mediated activation of the DAG-PKC θ -NF- κ B pathway by activating peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- α [7], we then assessed the potential involvement of PPARs in the effects of oleate on ER stress. Co-incubation of cells with palmitate and oleate and the PPAR antagonists did not reverse the effects of the monounsaturated fatty acid on the expression of the ER stress markers in C2C12 myotubes (ESM Fig. 1 a–f). In addition, since oleate activates protein kinase A (PKA) [31] and activation of this kinase can inhibit ER stress [32], we evaluated whether this mechanism was involved in the effects of oleate. In the presence of the PKA inhibitor H89, the effect of oleate on *sXbp1* in palmitate-exposed cells was not modified (ESM Fig. 2a). Further, we have previously reported that inhibition of fatty-acid oxidation by etomoxir reversed the effects of oleate on palmitate-

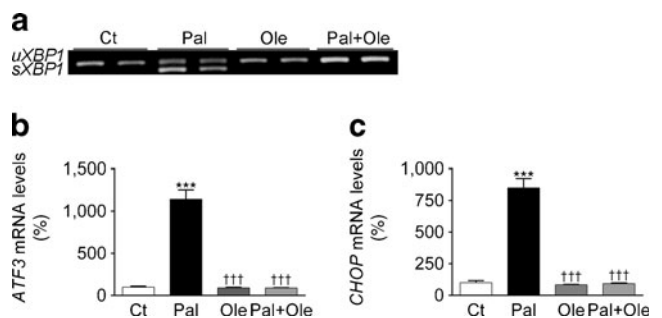


Fig. 2 Oleate prevents palmitate-induced ER stress in human skeletal muscle cells. LHCN-M2 myotubes were incubated for 16 h in the presence or absence (Ct, Control) of different fatty acids: 0.5 mmol/l palmitate (Pal), 0.5 mmol/l oleate (Ole) or 0.5 mmol/l palmitate supplemented with 0.3 mmol/l oleate (Pal + Ole). *sXBP1* (a), *ATF3* (b) and *CHOP* (c) mRNA levels. The graphs represent the quantification of the 18S-normalised mRNA levels, expressed as a percentage of control samples \pm SD of six independent experiments. *** p <0.001 vs Ct; ††† p <0.001 vs Pal

mediated activation of the DAG-PKC θ -NF- κ B pathway [7]. However, etomoxir failed to reverse the effects of oleate on palmitate-induced ER stress (ESM Fig. 2b). Since depletion of ER Ca²⁺ may contribute to palmitate-induced ER stress [33], we next assessed the effects of calcimycin, a Ca²⁺ mobiliser, and BAPTA-AM, a [Ca²⁺]_i chelator. Calcimycin increased *sXbp1* and *Chop* mRNA levels (ESM Fig. 2c, d), confirming that Ca²⁺ mobilisation is involved in ER stress in mouse skeletal muscle cells, as previously described [19]. However, co-incubation of cells with palmitate plus BAPTA-AM reduced neither *sXbp1* nor *Chop* expression, indicating that under our conditions Ca²⁺ mobilisation does not contribute to palmitate-induced ER stress. Finally, a recent study demonstrated that silent information regulator T1 (SIRT1) serves as a negative regulator of UPR in type 2 diabetes mellitus [34]. However, the SIRT1 inhibitor EX527 did not reverse the effect of oleate on palmitate-induced ER stress (ESM Fig. 2e, f), indicating that the effects of the monounsaturated fatty acid on palmitate-induced ER stress did not involve SIRT1.

Oleate prevents palmitate-induced ER stress through an AMPK-dependent mechanism It is worth noting that activation of AMPK, which is considered a pharmacological target for insulin resistance and type 2 diabetes mellitus [35], inhibits ER stress [18, 19, 21] whereas reduction of this kinase promotes ER stress [20]. To confirm a role for AMPK in the preventive effects of oleate on palmitate-induced ER stress in C2C12 myotubes, we used the AMPK activators AICAR and A-769662 and the AMPK inhibitor compound C. The increase in the expression of *sXbp1*, *Atf3*, *Chop* and *Bip* caused by palmitate was reduced in cells co-incubated with palmitate plus either AICAR or A-769662 (Fig. 3), suggesting that AMPK activation prevents palmitate-induced ER stress. In addition, when we co-incubated C2C12 and LHCN-M2 cells exposed to palmitate plus oleate with the AMPK inhibitor compound C we observed that the effect of oleate on the expression of *sXbp1/sXBP1*, *Atf3/AFT3* and *Chop* was abolished (Fig. 4). Given the association of ER stress with the activation of the inflammatory process and insulin resistance [14], next we tried to link the inhibitory effects of oleate on palmitate-induced ER stress with oleate's reported ability to prevent palmitate-induced inflammation and insulin resistance [7]. We evaluated the effect of fatty acids on the expression of *Il6* and its secretion, a cytokine under the transcriptional control of NF- κ B, which is involved in insulin resistance [10, 36]. Palmitate caused a 5.5-fold induction ($p < 0.01$) in *Il6* mRNA levels, which was of lower intensity to the induction observed with potent ER-stress inducer tunicamycin (Fig. 5a). In contrast to palmitate, oleate exposure did not affect *Il6* expression (Fig. 5b), whereas co-incubation of palmitate-exposed cells with oleate prevented the increase in *Il6*

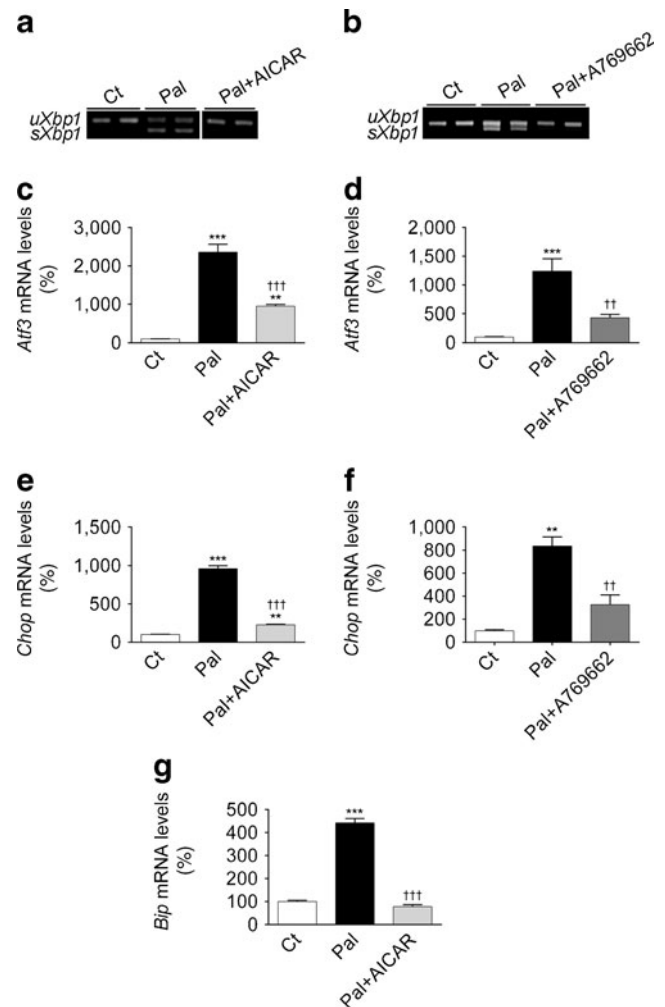


Fig. 3 AMPK activators prevent palmitate-induced ER stress in mouse skeletal muscle cells. C2C12 myotubes were incubated for 16 h in the presence or absence (Ct, Control) of 0.5 mmol/l palmitate (Pal) and the AMPK activators AICAR (2 mmol/l) or A-769662 (60 μ mol/l). *sXbp1* (a, b), *Atf3* (c, d), *Chop* (e, f) and *Bip* (g) mRNA levels. The graphs represent the quantification of the *aprt*-normalised mRNA levels, expressed as a percentage of control samples \pm SD of six independent experiments. *** $p < 0.001$ and ** $p < 0.01$ vs Ct; ††† $p < 0.001$ and †† $p < 0.01$ vs Pal

mRNA levels. Interestingly, in the presence of compound C, the effect of oleate in preventing the increase in *Il6* mRNA in palmitate-exposed cells was partially reversed. A similar pattern was observed when we determined the secretion of IL-6 into the culture medium (Fig. 5c). Of note, human skeletal muscle cells showed a similar behaviour to that reported for C2C12 myotubes (Fig. 5d). Since palmitate induces *IL6* mRNA expression and IL-6 secretion through NF- κ B activation driven by the reduction in I κ B α levels [7, 8], we next evaluated the effects of fatty acids on the protein levels of this NF- κ B inhibitor. Consistent with the changes in *Il6*, palmitate exposure reduced I κ B α protein levels in C2C12 myotubes (Fig. 5e). In contrast, oleate did not and co-incubation of palmitate-exposed

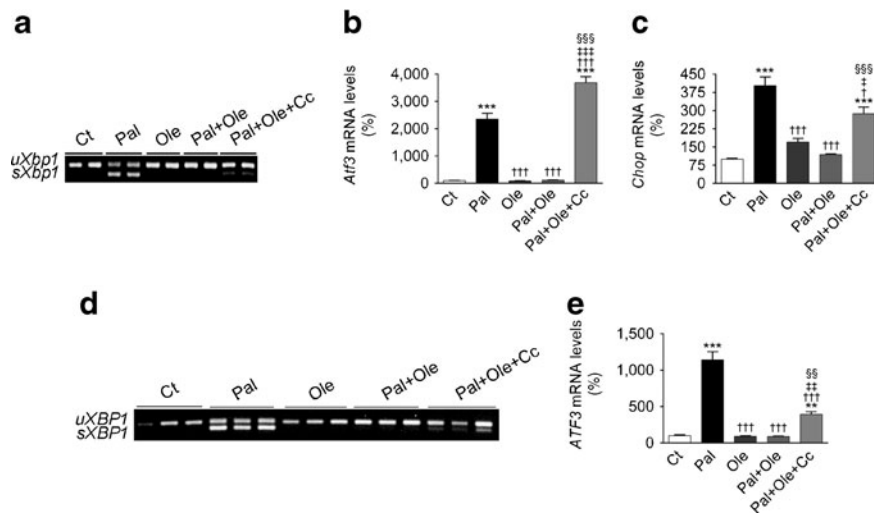


Fig. 4 Oleate prevents palmitate-induced ER stress in skeletal muscle cells through an AMPK-dependent mechanism. C2C12 or LHCN-M2 myotubes were incubated for 16 h in the presence or absence (Ct, Control) of different fatty acids: 0.5 mmol/l palmitate (Pal), 0.5 mmol/l oleate (Ole) or 0.5 mmol/l palmitate supplemented with 0.3 mmol/l oleate (Pal + Ole). Indicated cells were pre-incubated with 30 μ mol/l of the AMPK inhibitor compound C (Cc) 8 h before the exposure to fatty

acids. *sXbp1* (a), *Atf3* (b), *Chop* (c), human *sXBP1* (d) and human *ATF3* (e) mRNA levels. The graphs represent the quantification of the 18S- (LHCN-M2 human cells) or *aprt*-normalised mRNA levels, expressed as a percentage of control samples \pm SD of six independent experiments. *** p <0.001 and ** p <0.01 vs Ct; ††† p <0.001 and † p <0.05 vs Pal; †††† p <0.001, †† p <0.01 and † p <0.05 vs Ole; ††††† p <0.001 and †† p <0.01 vs Pal + Ole

cells with the monounsaturated fatty acid prevented this reduction. Moreover, co-incubation of palmitate-exposed cells with oleate plus compound C reversed the effect of oleate. Measurement of NF- κ B DNA-binding activity by EMSA confirmed these results. NF- κ B formed one main complex with nuclear proteins (Fig. 5f) and specificity of this DNA-binding complex was assessed in competition experiments by adding an excess of unlabelled NF- κ B oligonucleotide. Palmitate-exposed cells showed increased NF- κ B DNA-binding activity compared with control cells, whereas cells exposed to oleate did not; co-incubation of palmitate-exposed cells with oleate prevented this increase. Interestingly, in the presence of compound C the effect of oleate on palmitate-exposed cells was blunted (Fig. 5f).

Then we evaluated whether AMPK activation by oleate contributed to the prevention of the reduction in insulin-stimulated Akt phosphorylation caused by palmitate exposure in C2C12 myotubes. Palmitate reduced insulin-stimulated Akt phosphorylation and this effect was not observed in cells exposed to oleate or in palmitate-exposed cells supplemented with oleate (Fig. 6a). In addition, the AMPK activators AICAR and A-769662 prevented this effect of palmitate (Fig. 6a). Likewise, the ER stress inducer thapsigargin reduced insulin-stimulated Akt phosphorylation. Of note, the effect of oleate on palmitate-exposed cells was reversed in the presence of compound C, indicating that the ability of oleate to prevent palmitate-induced insulin resistance requires AMPK activation. To further underpin the importance of ER stress in palmitate-induced insulin resistance in our conditions we incubated cells with

palmitate in the presence of phenylbutyric acid (PBA), a pharmacological chaperone that reduces cellular ER stress and improves insulin sensitivity [37]. PBA prevented the reduction in insulin-stimulated Akt phosphorylation caused by palmitate (Fig. 6b). A similar trend to that reported for Akt was observed when we assessed 2-DG uptake (Fig. 6c). Interestingly, the ER stress inducer tunicamycin caused a similar reduction in insulin-stimulated 2-DG to that attained by palmitate.

To clearly confirm the involvement of AMPK in the effects of oleate, we manipulated AMPK activity in C2C12 cells by a molecular approach, involving overproduction of an AMPK α subunit with a point mutation that causes the enzyme to function as a dominant negative suppressor of endogenous AMPK activity (K45R). Overproduction of this construct in C2C12 cells leads to the displacement of endogenous subunits, followed by degradation of free alpha subunit [24]. This resulted in a reduction in total protein AMPK levels (Fig. 7a) and in its activity, determined by the decrease in acetyl-CoA carboxylase (ACC) phosphorylation (Fig. 7b). ACC is a substrate for AMPK [38] and serves as an indicator of AMPK activity. Inhibition of AMPK activity attenuated the effect of oleate in palmitate-exposed cells on IRE1 α activation (Fig. 7c), I κ B α protein levels (Fig. 7d) and insulin-stimulated Akt phosphorylation (Fig. 7e), suggesting that oleate prevents palmitate-induced inflammation and insulin resistance through an AMPK-dependent mechanism.

Oleate prevents the reduction in phospho-AMPK induced by palmitate Finally, we evaluated the potential mechanism

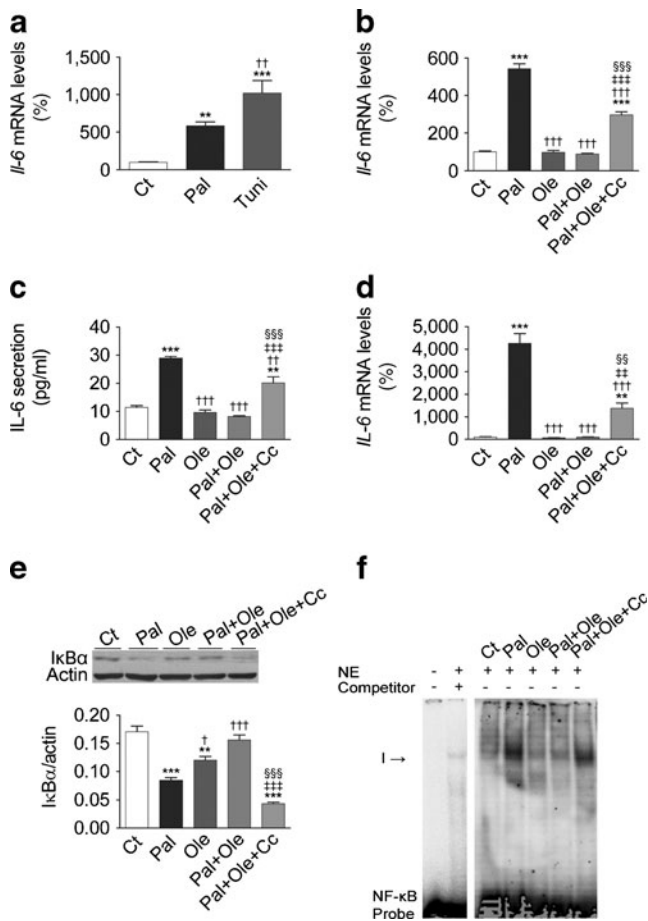


Fig. 5 Oleate prevents palmitate-induced inflammation in skeletal muscle cells through an AMPK-dependent mechanism. C2C12 or LHCN-M2 myotubes were incubated for 16 h in the presence or absence (Ct, Control) of different fatty acids: 0.5 mmol/l palmitate (Pal), 0.5 mmol/l oleate (Ole) or 0.5 mmol/l palmitate supplemented with 0.3 mmol/l oleate (Pal + Ole). Indicated cells were pre-incubated with 30 μ mol/l of the AMPK inhibitor compound C (Cc) before the exposure to fatty acids. Relative quantification of mouse *Il6* (a, b) and human *IL6* (d) mRNA levels assessed by real-time RT-PCR. The graphs represent the quantification of the housekeeping-gene-normalised mRNA levels, expressed as a percentage of control samples \pm SD of six independent experiments. Mouse IL-6 secretion levels (c) were analysed by ELISA. C2C12 cell lysates were analysed by western blot using antibodies against total and phospho-Akt (Ser⁴⁷³). Indicated cells were incubated with 100 nmol/l insulin (Ins) for the last 10 min. Immunoblots from three separate experiments were quantified and presented in the corresponding bar graphs. (c) 2-DG uptake was assessed without or with insulin. Values are means \pm SD of six independent experiments. $^{\$}$ $^{\$}$ $^{\$}$ $p < 0.001$ and $^{\$}$ $p < 0.05$ vs Ct cells not exposed to insulin (Ct-Ins); *** $p < 0.001$ and * $p < 0.05$ vs Ct cells exposed to insulin (Ct + Ins); $^{+++}$ $p < 0.001$ and † $p < 0.05$ vs Pal; ** $p < 0.01$ and ‡ $p < 0.05$ vs Pal + Ole and ss $p < 0.01$ vs Pal + Ole

responsible for the effect of fatty acids on AMPK activity. AMPK activation was monitored by western blot by incubating with a specific antibody against phosphorylated Thr¹⁷² of AMPK, which is essential for its activity [39]. When we examined the total and phospho-AMPK protein levels in C2C12 skeletal muscle cells exposed to fatty acids

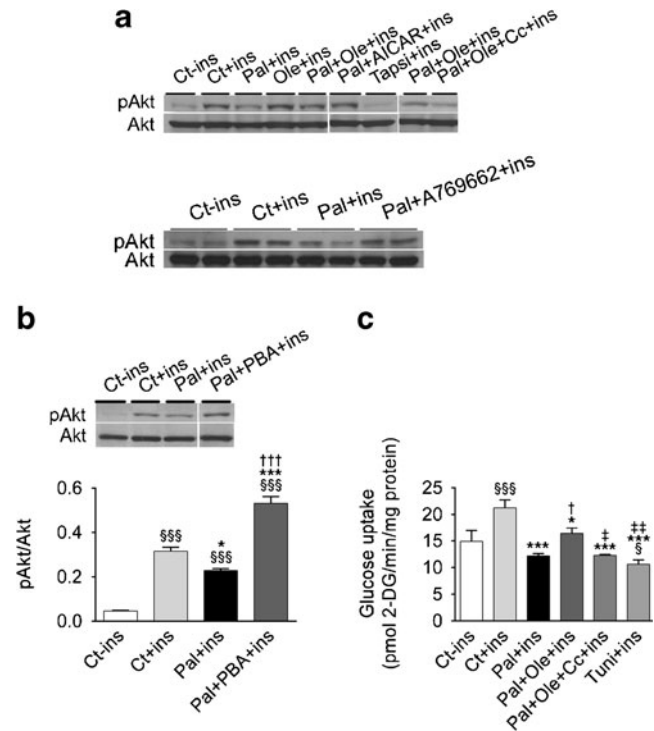
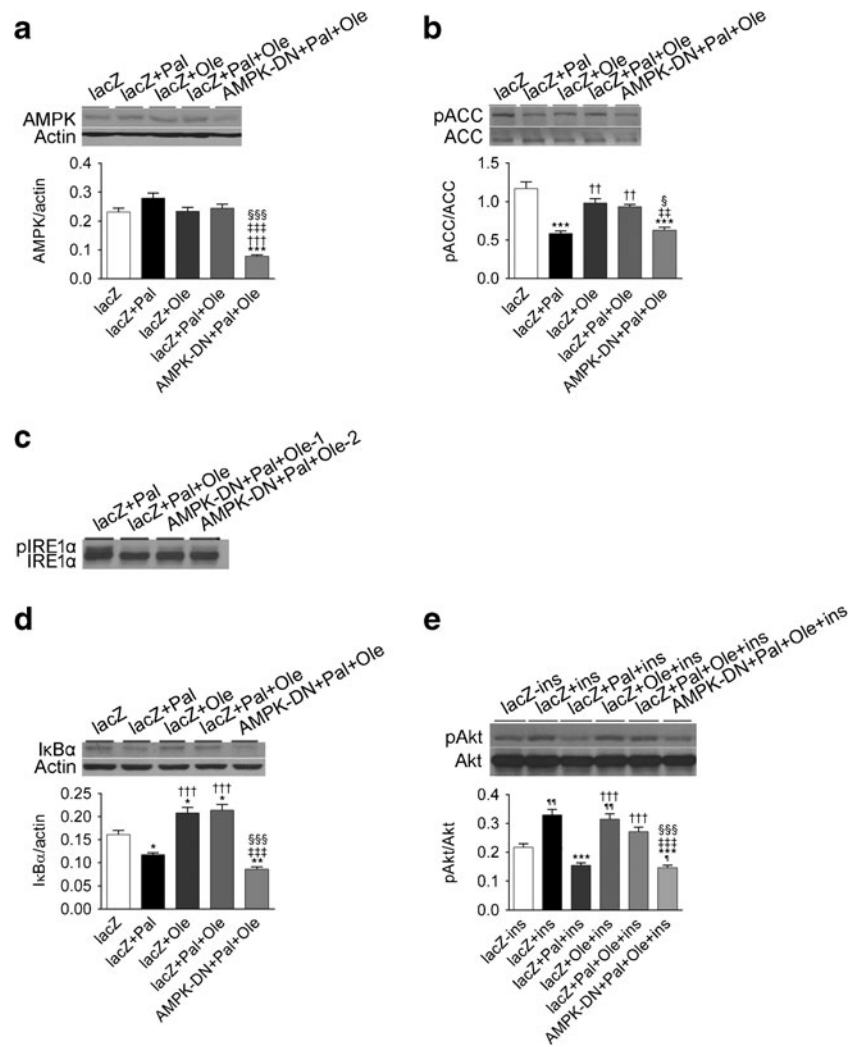


Fig. 6 Oleate prevents palmitate-induced insulin resistance in mouse skeletal muscle cells through an AMPK-dependent mechanism. C2C12 myotubes were incubated for 16 h in the presence or absence (Ct, Control) of different fatty acids: 0.5 mmol/l palmitate (Pal), 0.5 mmol/l oleate (Ole) or 0.5 mmol/l palmitate supplemented with 0.3 mmol/l oleate (Pal + Ole). Indicated cells were pre-incubated with 30 μ mol/l of the AMPK inhibitor compound C, 2 mmol/l of AICAR, 60 μ mol/l of A-769662, 2 mmol/l of the ER stress inhibitor PBA, 1 μ mol/l of thapsigargin (Tapsi) or 5 μ g/ml tunicamycin (Tuni). (a, b) C2C12 cell lysates were analysed by western blot using antibodies against total and phospho-Akt (Ser⁴⁷³). Indicated cells were incubated with 100 nmol/l insulin (Ins) for the last 10 min. Immunoblots from three separate experiments were quantified and presented in the corresponding bar graphs. (c) 2-DG uptake was assessed without or with insulin. Values are means \pm SD of six independent experiments. $^{\$}$ $^{\$}$ $^{\$}$ $p < 0.001$ and $^{\$}$ $p < 0.05$ vs Ct cells not exposed to insulin (Ct-Ins); *** $p < 0.001$ and * $p < 0.05$ vs Ct cells exposed to insulin (Ct + Ins); $^{+++}$ $p < 0.001$ and † $p < 0.05$ vs Pal; ** $p < 0.01$ and ‡ $p < 0.05$ vs Pal + Ole

we observed that palmitate caused a reduction in phospho-AMPK levels compared with control cells (Fig. 8a). Unlike palmitate, oleate did not affect phospho-AMPK levels. Further, oleate supplementation prevented the reduction in phospho-AMPK levels caused by palmitate. Consistent with the phospho-AMPK levels, ACC-Ser⁷⁹ was reduced in palmitate-exposed cells, whereas this reduction was not observed in cells exposed to oleate or in palmitate-exposed cells supplemented with oleate (Fig. 8b). The control of AMPK is complex and its phosphorylation status is regulated by both phosphatases and kinases [35]. Since a previous study reported that palmitate inhibited AMPK phosphorylation via ceramide-dependent phosphatase 2A (PP2A) activation in endothelial cells [40], we first examined the abundance of the PP2A/AC catalytic subunit. Fatty acids did not affect the protein levels of this phosphatase (Fig. 8c),

Fig. 7 The effects of oleate on ER stress, inflammation and insulin sensitivity in palmitate-exposed mouse skeletal muscle cells are AMPK dependent. C2C12 myotubes transfected with LacZ- or pAMPK α 2 K45R-carrying plasmids were incubated for 16 h in the presence or absence of different fatty acids: 0.5 mmol/l palmitate (Pal), 0.5 mmol/l oleate (Ole) or 0.5 mmol/l palmitate supplemented with 0.3 mmol/l oleate (Pal + Ole). Cell lysates were analysed by western blot using antibodies against total AMPK and actin (a), total and phospho-ACC (Ser⁷⁹) (b), IRE-1 α (c) I κ B α (d) and total and phospho-Akt (Ser⁴⁷³) (e). Indicated cells were incubated with 100 nmol/l insulin (Ins) for the last 10 min. Data are expressed as mean \pm SD of four experiments. ^{†††} p <0.001 and ^{††} p <0.01 vs LacZ -Ins; ^{***} p <0.001, ^{**} p <0.01 and ^{*} p <0.05 vs LacZ + Ins; ^{††††} p <0.0001 and ^{†††} p <0.001 vs Pal; ^{†††††} p <0.00001 and ^{††††} p <0.0001 vs Ole; ^{§§§} p <0.001 and ^{§§} p <0.01 vs Pal + Ole; DN, dominant negative



making its contribution to the changes observed unlikely. Although in skeletal muscle cells LKB1 is the main upstream kinase regulating AMPK activity [41], we did not observe changes in the protein levels of LKB1 (Fig. 8d). Moreover, AMPK is activated allosterically by an increase in the intracellular AMP levels [35]. Even with minimal reduction in cellular ATP, changes in the concentration of AMP can activate AMPK [42]. Thus, we measured the AMP levels by HPLC to determine whether fatty acids affected its concentrations. Interestingly, palmitate reduced AMP levels compared with control cells or cells exposed to oleate, whereas in palmitate-exposed cells supplemented with oleate a significant increase was observed (Fig. 8e).

Discussion

High-fat diets are known to cause insulin resistance and type 2 diabetes mellitus, mainly due to their fatty-acid content. However, whereas saturated fatty acids promote insulin

resistance [2, 3], the monounsaturated oleic acid improves insulin sensitivity [4, 5]. This has led to the suggestion that dietary intake of oleic acid should be used as a substitute for saturated fatty acids in the management of type 2 diabetes mellitus [43]. There is increasing evidence that the Mediterranean diet has a protective effect on both obesity and diabetes. This diet is characterised by a specific fatty acid pattern; it is low in saturated fatty acids (7–8% of energy) and high in monounsaturated fatty acids (over 20% of total energy), because the fat source consists primarily of olive oil [44]. However, the mechanisms by which oleate may improve insulin resistance are not completely known.

This study provides the first evidence that the monounsaturated fatty acid oleate prevents saturated-fatty-acid-induced ER stress, inflammation and insulin resistance through AMPK activation. First, we show that oleate, in contrast to palmitate, does not increase the levels of ER stress markers. In addition, oleate supplementation at a low concentration provides a marked protection against ER stress and reduces the levels of these markers to those present in control cells. It is worth noting that the changes

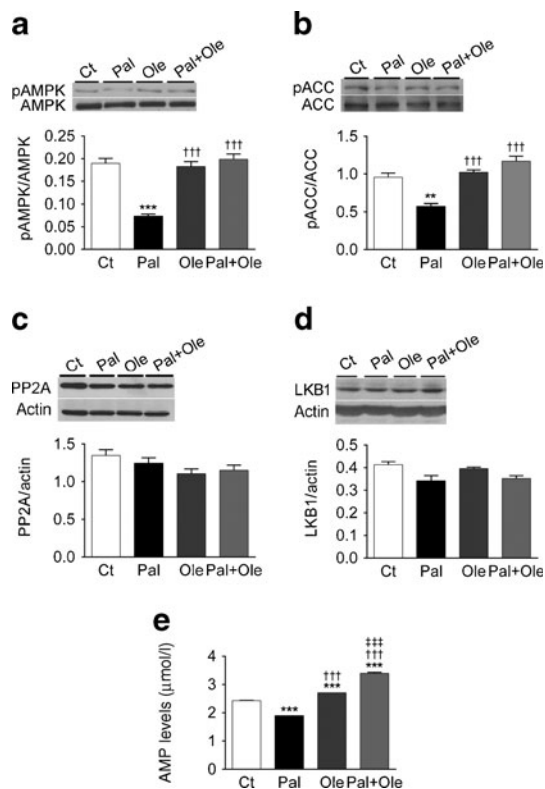


Fig. 8 Oleate prevents the palmitate-mediated reduction in phospho-AMPK levels in mouse skeletal muscle cells. C2C12 myotubes were incubated for 16 h in the presence or absence (Ct, Control) of different fatty acids: 0.5 mmol/l palmitate (Pal), 0.5 mmol/l oleate (Ole) or 0.5 mmol/l palmitate supplemented with 0.3 mmol/l oleate (Pal + Ole). Cell lysates were analysed by western blot using antibodies against total and phospho-AMPK (Thr¹⁷²) (a), total and phospho-ACC (Ser⁷⁹) (b), PP2A (c) and LKB1 (d). (e) AMP levels in C2C12 myotubes exposed to fatty acids. Data are expressed as mean \pm SD of four experiments. *** p <0.001 and ** p <0.01 vs Ct; +++ p <0.001 vs Pal; +++ p <0.001 vs Ole

observed in the mouse cell line C2C12 were confirmed in human skeletal muscle cells, indicating that the effects of oleate are not species specific. Our findings discard the involvement of PPARs, Ca²⁺, SIRT1, PKA or increased fatty acid oxidation in the effects attained by oleate. Likewise, even though extracellular-signal-regulated kinase (ERK)1/2 has been involved in palmitate-induced NF- κ B activation [45], no changes were observed in ER stress markers in cells co-incubated with palmitate plus U0126 (a MEK1/2 [mitogen-activated protein kinase]–ERK1/2 inhibitor) compared with cells incubated with only the saturated fatty acid, whereas *IL6* mRNA levels were reduced (data not shown). Furthermore, oleate exposure did not affect palmitate uptake since we have previously reported that the total content of intracellular lipids is similar in palmitate- and palmitate-plus-oleate-exposed cells [7]. However, AMPK activation prevented the increase in ER stress markers in palmitate-exposed skeletal muscle cells. This is consistent with previous studies reporting that AMPK

activation protects against hypoxic injury [18], atherosclerosis [19] and liver damage [21] by reducing ER stress. By using the AMPK inhibitor compound C and overproduction of a dominant negative AMPK construct we demonstrated that activation of this kinase was responsible for the reduction in ER stress attained by oleate in palmitate-exposed cells. Since ER stress is emerging as a potential site for the intersection of inflammation and insulin resistance [11], we assessed in our conditions the contribution of ER stress and AMPK activation to these processes. Interestingly, ER stress can activate NF- κ B via translational suppression of I κ B α , resulting in the upregulation of mediators of inflammation and insulin resistance, such as *IL6* [46]. Consistent with this, the ER stress inducers tunicamycin and thapsigargin increased the expression of *IL6* and reduced insulin-stimulated Akt phosphorylation, respectively. Likewise, PBA, which reduces cellular ER stress, prevented the reduction in insulin-stimulated Akt phosphorylation caused by palmitate. These findings are in agreement with those of a previous study [15] but contrast with those reported in a recent study indicating that ER stress does not mediate palmitate-induced insulin resistance [47]. We do not know the reasons for this discrepancy, but differences in the fatty acid–BSA conjugation could be involved.

Overall, these findings confirm the role of ER stress in inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells. Moreover, the ability of oleate to prevent the reduction in I κ B α protein levels in palmitate-exposed cells was blocked by the AMPK inhibitor compound C and by overproduction of the dominant negative AMPK construct, suggesting that AMPK activation by oleate contributes to the prevention of palmitate-induced inflammation. In agreement with the changes in markers of inflammation, AICAR, A-769662 and oleate improved the reduction in insulin-stimulated Akt phosphorylation that had been caused by palmitate. The improvement achieved by oleate was prevented in cells supplemented with oleate plus compound C or cells in which the dominant negative AMPK was overproduced. These data confirm that oleate improves palmitate-induced insulin resistance through AMPK activation.

As a whole, the findings of this study show that AMPK activation by oleate contributes to the prevention of palmitate-induced inflammation and insulin resistance. In addition, our data also show that AMPK activation by oleate also prevents palmitate-induced NF- κ B activation in human skeletal muscle cells. This is an interesting point, since NF- κ B is activated in myocytes from obese individuals with type 2 diabetes compared with non-obese control individuals, whereas AMPK activation attenuates NF- κ B activation [48].

Interestingly, it has been reported that reduction in AMPK levels promotes ER stress, suggesting that AMPK functions as a physiological suppressor of ER stress [20]. When we examined the potential mechanisms responsible for the increase in ER stress following palmitate exposure and the protective

effects of oleate, we observed that the saturated fatty acid reduced phospho-AMPK levels. In contrast, neither oleate nor palmitate-exposed cells supplemented with oleate showed changes in the levels of this kinase. Since it has been reported that high-fat-diet feeding significantly decreases phospho-AMPK in the liver and muscles of rodents [49], these findings suggest that the saturated fatty acids in these diets contribute to this reduction.

The regulation of AMPK is complex, involving allosteric control by an increase in the cellular content of AMP and covalent regulation through phosphorylation of Thr¹⁷² within the catalytic subunit by upstream kinase LKB1 and dephosphorylation by PP2A. Our data show that palmitate reduces AMP levels, whereas no changes were observed in cells exposed to oleate; in those exposed to palmitate and supplemented with oleate, AMP levels were higher than in control cells. These findings indicate that palmitate reduces AMPK activity through a reduction in AMP levels, whereas oleate supplementation can prevent the reduction caused by palmitate in the concentration of this nucleotide.

In summary, on the basis of our findings we propose that oleate prevents palmitate-induced ER stress, inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells through AMPK activation. These findings offer a new mechanistic approach to the beneficial effects of oleate vs the saturated fatty acid palmitate in skeletal muscle insulin resistance.

Acknowledgements We thank A. Orozco (Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain) for experimental assistance with human myotube cultures. We thank M. J. Birnbaum (Howard Hughes Medical Institute, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA) for the pcDNA3/pAMPKalpha2-K45R plasmid. We would like to thank the University of Barcelona's Language Advisory Service for revising the manuscript. M. Vázquez-Carrera is the guarantor of this work, had full access to all the data, and takes full responsibility for the integrity of data and the accuracy of data analysis.

Funding This study was partly supported by funds from the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2009-06939 and SAF2012-30708) and European Union ERDF funds. CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM) is an Instituto de Salud Carlos III project. L. Salvadó was supported by an FPI grant from the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad.

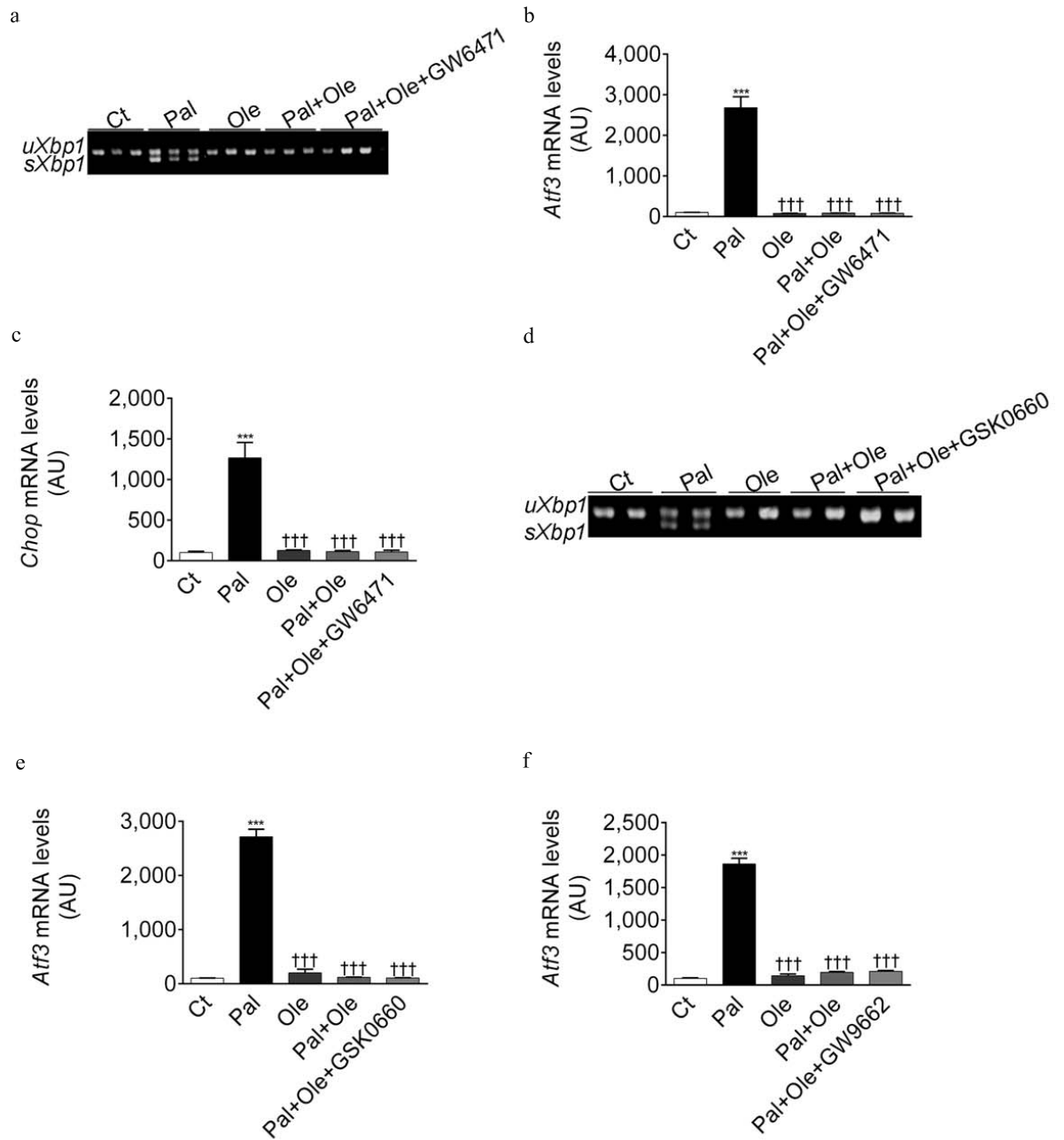
Duality of interest The authors declare that there is no duality of interest associated with this manuscript.

Contribution statement LS, TC, ES, EB, AMG-F, XP and MV-C processed the samples, analysed and prepared the data and were involved in drafting the article. LS, ES, AMG-F and XP contributed to the interpretation of the data and revised the article. MV-C designed the experiments, analysed and interpreted the data and wrote the manuscript. All authors approved the final version of the manuscript.

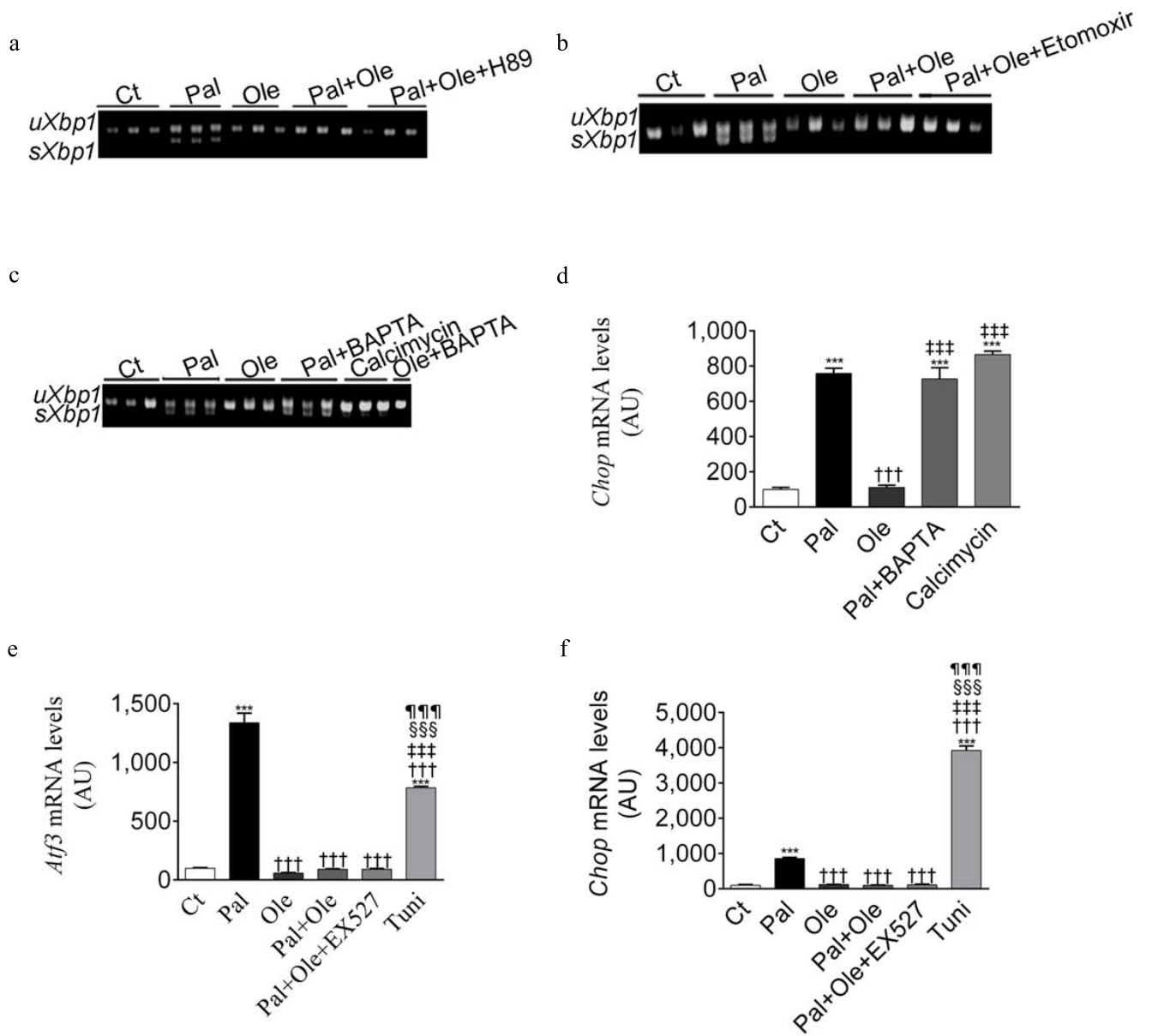
References

1. Boden G (1997) Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* 46:3–10
2. Vessby B, Uusitupa M, Hermansen K et al (2001) Substituting dietary saturated for monounsaturated fat impairs insulin sensitivity in healthy men and women: the KANWU study. *Diabetologia* 44:312–319
3. Hu FB, van Dam RM, Liu S (2001) Diet and risk of type II diabetes: the role of types of fat and carbohydrate. *Diabetologia* 44:805–817
4. Parillo M, Rivellese AA, Ciardullo AV et al (1992) A high-monounsaturated-fat/low-carbohydrate diet improves peripheral insulin sensitivity in non-insulin-dependent diabetic patients. *Metabolism* 41:1373–1378
5. Ryan M, McInerney D, Owens D, Collins P, Johnson A, Tomkin GH (2000) Diabetes and the Mediterranean diet: a beneficial effect of oleic acid on insulin sensitivity, adipocyte glucose transport and endothelium-dependent vasoreactivity. *QJM* 93:85–91
6. Wellen KE, Hotamisligil GS (2005) Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 115:1111–1119
7. Coll T, Eyre E, Rodríguez-Calvo R et al (2008) Oleate reverses palmitate-induced insulin resistance and inflammation in skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 283:11107–11116
8. Senn JJ (2006) Toll-like receptor-2 is essential for the development of palmitate-induced insulin resistance in myotubes. *J Biol Chem* 281:26865–26875
9. Kim JK, Kim YJ, Fillmore JJ et al (2001) Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate. *J Clin Invest* 108:437–446
10. Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G (2001) Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280:E745–E751
11. Hotamisligil GS (2010) Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell* 140:900–917
12. Zhang K, Kaufman RJ (2008) From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* 454:455–462
13. Marchetti P, Bugliani M, Lupi R et al (2007) The endoplasmic reticulum in pancreatic beta cells of type 2 diabetes patients. *Diabetologia* 50:2486–2494
14. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E et al (2004) Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 306:457–461
15. Peng G, Li L, Liu Y et al (2011) Oleate blocks palmitate-induced abnormal lipid distribution, endoplasmic reticulum expansion and stress, and insulin resistance in skeletal muscle. *Endocrinology* 152:2206–2218
16. Eizirik DL, Cardozo AK, Cnop M (2008) The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Endocr Rev* 29:42–61
17. Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D et al (2005) The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science* 310:1642–1646
18. Terai K, Hiramoto Y, Masaki M et al (2005) AMP-activated protein kinase protects cardiomyocytes against hypoxic injury through attenuation of endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol* 25:9554–9575
19. Dong Y, Zhang M, Wang S et al (2010) Activation of AMP-activated protein kinase inhibits oxidized LDL-triggered endoplasmic reticulum stress in vivo. *Diabetes* 59:1386–1396
20. Dong Y, Zhang M, Liang B et al (2010) Reduction of AMP-activated protein kinase alpha2 increases endoplasmic reticulum stress and atherosclerosis in vivo. *Circulation* 121:792–803
21. Wang Y, Wu Z, Li D et al (2011) Involvement of oxygen-regulated protein 150 in AMP-activated protein kinase-mediated alleviation of lipid-induced endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* 286:11119–11131

22. Silveira LR, Fiamoncini J, Hirabara SM et al (2008) Updating the effects of fatty acids on skeletal muscle. *J Cell Physiol* 217:1–12
23. Gorski J, Nawrocki A, Murthy M (1998) Characterization of free and glyceride-esterified long chain fatty acids in different skeletal muscle types of the rat. *Mol Cell Biochem* 178:113–118
24. Mu J, Brozinick JT, Valladares O, Bucan M, Birnbaum MJ (2001) A role for AMP-activated protein kinase in contraction- and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle. *Mol Cell* 7:1085–1094
25. Zhu CH, Mouly V, Cooper RN et al (2007) Cellular senescence in human myoblasts is overcome by human telomerase reverse transcriptase and cyclin-dependent kinase 4: consequences in aging muscle and therapeutic strategies for muscular dystrophies. *Aging Cell* 6:515–523
26. Esk C, Chen CY, Johannes L, Brodsky FM (2010) The clathrin heavy chain isoform CHC22 functions in a novel endosomal sorting step. *J Cell Biol* 188:131–144
27. Palomer X, Alvarez-Guardia D, Rodríguez-Calvo R et al (2009) TNF- α reduces PGC-1 α expression through NF- κ B and p38 MAPK leading to increased glucose oxidation in a human cardiac cell model. *Cardiovasc Res* 81:703–712
28. Guo W, Wong S, Xie W, Lei T, Luo Z (2007) Palmitate modulates intracellular signaling, induces endoplasmic reticulum stress, and causes apoptosis in mouse 3T3-L1 and rat primary preadipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293:E576–E586
29. Martinon F, Chen X, Lee AH, Glimcher LH (2010) TLR activation of the transcription factor XBP1 regulates innate immune responses in macrophages. *Nat Immunol* 11:411–418
30. Srivastava RK, Sollott SJ, Khan L, Hansford R, Lakatta EG, Longo DL (1999) Bcl-2 and Bcl-X(L) block thapsigargin-induced nitric oxide generation, c-Jun NH(2)-terminal kinase activity, and apoptosis. *Mol Cell Biol* 19:5659–5674
31. Chang CH, Chey WY, Chang TM (2000) Cellular mechanism of sodium oleate-stimulated secretion of cholecystokinin and secretin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279:G295–G303
32. Yusta B, Baggio LL, Estall JL et al (2006) GLP-1 receptor activation improves beta cell function and survival following induction of endoplasmic reticulum stress. *Cell Metab* 4:391–406
33. Gwiazda KS, Yang TL, Lin Y, Johnson JD (2009) Effects of palmitate on ER and cytosolic Ca²⁺ homeostasis in beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296:E690–E701
34. Li Y, Xu S, Giles A et al (2011) Hepatic overexpression of SIRT1 in mice attenuates endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in the liver. *FASEB J* 25:1664–1679
35. Zhang BB, Zhou G, Li C (2009) AMPK: an emerging drug target for diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metab* 9:407–416
36. Pickup JC, Mattock MB, Chusney GD, Burt D (1997) NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. *Diabetologia* 40:1286–1292
37. Ozcan U, Yilmaz E, Ozcan L et al (2006) Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science* 313:1137–1140
38. Ruderman NB, Saha AK, Vavvas D, Witters LA (1999) Malonyl-CoA, fuel sensing, and insulin resistance. *Am J Physiol* 276:E1–E18
39. Hawley SA, Davison M, Woods A et al (1996) Characterization of the AMP-activated protein kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 271:27879–27887
40. Wu Y, Song P, Xu J, Zhang M, Zou MH (2007) Activation of protein phosphatase 2A by palmitate inhibits AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 282:9777–9788
41. Watt MJ, Steinberg GR, Chen ZP, Kemp BE, Febbraio MA (2006) Fatty acids stimulate AMP-activated protein kinase and enhance fatty acid oxidation in L6 myotubes. *J Physiol* 574:139–147
42. Zhou M, Lin BZ, Coughlin S, Vallega G, Pilch PF (2000) UCP-3 expression in skeletal muscle: effects of exercise, hypoxia, and AMP-activated protein kinase. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279:E622–E629
43. Berry EM (1997) Dietary fatty acids in the management of diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr* 66:991S–997S
44. Bergouignan A, Momken I, Schoeller DA, Simon C, Blanc S (2009) Metabolic fate of saturated and monounsaturated dietary fats: the Mediterranean diet revisited from epidemiological evidence to cellular mechanisms. *Prog Lipid Res* 48:128–147
45. Green CJ, McRae K, Fogarty S, Hardie DG, Sakamoto K, Hundal HS (2011) Counter-modulation of fatty acid-induced pro-inflammatory nuclear factor κ B signalling in rat skeletal muscle cells by AMP-activated protein kinase. *Biochem J* 435:463–474
46. Deng J, Lu PD, Zhang Y et al (2004) Translational repression mediates activation of nuclear factor κ B by phosphorylated translation initiation factor 2. *Mol Cell Biol* 24:10161–10168
47. Hage Hassan R, Hainault I, Vilquin JT et al (2012) Endoplasmic reticulum stress does not mediate palmitate-induced insulin resistance in mouse and human muscle cells. *Diabetologia* 55:204–214
48. Green CJ, Pedersen M, Pedersen BK, Scheele C (2011) Elevated NF- κ B activation is conserved in human myocytes cultured from obese type 2 diabetic patients and attenuated by AMP-activated protein kinase. *Diabetes* 60:2810–2819
49. Muse ED, Obici S, Bhanot S et al (2004) Role of resistin in diet-induced hepatic insulin resistance. *J Clin Invest* 114:232–239



Supplemental Figure 1



Supplemental Figure 2

PUBLICACIÓ 2

PPAR β/δ prevents endoplasmic reticulum stress-associated inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells through an AMPK-dependent mechanism

Laia Salvadó, Emma Barroso, Anna Maria Gómez-Foix, Xavier Palomer, Liliane Michalik, Walter Wahli i Manuel Vázquez-Carrera

Diabetologia (En premsa)

Cada vegada hi ha proves més evidents que estableixen un vincle entre l'estrès del RE i l'activació dels processos inflamatoris que precedeixen la RI. Així, alteracions en l'homeòstasi del RE resulten en l'activació d'una resposta adaptativa coneguda com UPR, la qual condueix a un estat patològic en activar-se de forma crònica. Atès que el múscul esquelètic es el principal teixit responsable de la captació de glucosa depenent d'insulina, l'activació crònica de l'estrès del RE en aquest teixit condueix a l'activació de vies inflamatòries que precedeixen la RI.

És àmpliament conegut que l'AMPK exerceix múltiples efectes beneficiosos en l'organisme inhibint processos inflamatoris, l'estrès oxidatiu i la RI. Recentment ha estat descrit que aquesta cinasa redueix l'estrès del RE i, a més, diferents autors proposen la presència d'una regulació negativa entre les proteïnes AMPK i ERK1/2. Tanmateix, diferents estudis demostren que la inhibició de la cinasa ERK1/2 pot activar vies de senyalització que involucren l'AMPK i l'AKT, evitant així la RI induïda per l'estrès del RE en múscul esquelètic.

Actualment es coneix que PPAR α i PPAR γ són dianes de fàrmacs hipolipemians i antidiabètics, respectivament. El tercer membre d'aquesta família de receptors nuclears, PPAR β/δ , ha estat assenyalat com a una potencial diana terapèutica per al tractament de la RI, ja que es capaç d'incrementar la β -oxidació mitocondrial i, com a conseqüència, evitar processos inflamatoris i de RI en múscul esquelètic. Més recentment ha estat descrit que l'activació de PPAR β/δ podria inhibir l'estrès del RE en aorta i fetge, encara que els mecanismes responsables d'aquests efectes no han estat identificats.

Per aquest motiu, l'**objectiu** d'aquest treball ha estat determinar si l'activació de PPAR β/δ es capaç d'evitar la inflamació i la RI en múscul esquelètic mitjançant mecanismes que involucren l'estrès del RE, així com elucidar si la cinasa AMPK està involucrada en aquest procés.

Els **resultats** obtinguts evidencien que l'activació farmacològica de PPAR β/δ redueix l'estrès del RE induït per lípids en cèl·lules musculars esquelètiques. En concret, l'activació de PPAR β/δ mitjançant GW501516 va evitar l'increment en els nivells d'expressió gènica d'*sXbp1*, *Bip*, *Grp94*, *Orp150*, així com els nivells de fosforilació d'IRE1 α en cèl·lules de múscul esquelètic incubades amb palmitat. A més, el lligand de PPAR β/δ va reduir els nivells de fosforilació d'IRE1 α , així com els nivells de BIP incrementats en múscul esquelètic de ratolins alimentats amb una dieta rica en greixos. Tanmateix, l'activació farmacològica de PPAR β/δ també va evitar l'estrès del RE, la inflamació i la RI induïda per coneguts activadors d'estrès del RE en cèl·lules

musculars esquelètiques mitjançant mecanismes que involucraven l'AMPK. Així doncs, el GW501516 va reduir els nivells d'expressió gènica d'*sXBP1*, *CHOP* i *ATF3*, així com els nivells de fosforilació d'IRE1 α incrementats per la taspigargina. En línia amb aquests resultats, l'activador de PPAR β/δ va evitar l'increment en els nivells d'expressió gènica de *CHOP*, *ATF3*, *Grp94* i *Orp150* induïts per la tunicamicina en cèl·lules de múscul esquelètic.

El paper antiinflamatori del GW501516 es va confirmar en evitar l'activació del FT NF- κ B, així com els nivells d'expressió d'*IL-6* i *Tnf α* incrementats en resposta a l'activació de l'estrès del RE. Igualment, el GW501516 evità la reducció en els nivells de fosforilació de la proteïna AKT i en la captació de glucosa secundària a l'administració de tunicamicina. A més, la intolerància a la glucosa observada en ratolins deficientes en PPAR β/δ s'acompanyava d'un increment en la fosforilació d'IRE1 α . Els efectes del GW501516 sobre la inflamació i la RI induïda per l'estrès del RE es van revertir sobreexpressant un plasmidi que contenia un gen que codifica per un mutant de la proteïna AMPK el qual desplaça l'AMPK endògena, fet que suggeria que els efectes del GW501516 sobre l'estrès del RE, la inflamació i la RI implicaven aquesta cinasa. A més, es va confirmar la regulació negativa entre les proteïnes AMPK i ERK1/2 en aquest model cel·lular atès que la reducció en els nivells de fosforilació de l'AMPK en cèl·lules incubades amb tunicamicina s'acompanyà d'un increment en la fosforilació d'ERK1/2. Tanmateix, tant l'activació de PPAR β/δ mitjançant GW501516 com la inhibició de l'ERK1/2 mitjançant U0126 van incrementar els nivells de fosforilació d'AMPK.

En **resum**, podem concloure que l'activació de PPAR β/δ evita la inflamació i la RI induïdes per l'estrès del RE en cèl·lules musculars esquelètiques mitjançant mecanismes que involucren l'activació de l'AMPK.

Article

PPAR β/δ prevents endoplasmic reticulum stress-associated inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells through an AMPK-dependent mechanism

Laia Salvadó^{1,2}, Emma Barroso^{1,2}, Anna Maria Gómez-Foix^{2,3}, Xavier Palomer^{1,2}, Liliane Michalik⁴, Walter Wahli^{4,5} and Manuel Vázquez-Carrera^{1,2}

1. Department of Pharmacology and Therapeutic Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Institute of Biomedicine of the University of Barcelona (IBUB), Diagonal 643, E-08028 Barcelona, Spain

2. Spanish Biomedical Research Centre in Diabetes and Associated Metabolic Diseases (CIBERDEM), Spain, www.ciberdem.org

3. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, University of Barcelona, IBUB, Barcelona, Spain

4. Center for Integrative Genomics, National Research Center Frontiers in Genetics, University of Lausanne, Lausanne, Switzerland

5. Lee Kong Chian School of Medicine, Nanyang Technological University, Singapore, Republic of Singapore

Corresponding author

M. Vázquez-Carrera, Department of Pharmacology and Therapeutic Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Diagonal 643, E-08028 Barcelona, Spain

E-mail: mvazquezcarrera@ub.edu

Received: 14 May 2014 / Accepted: 26 June 2014

Abstract

Aim/hypothesis Endoplasmic reticulum (ER) stress, which is involved in the link between inflammation and insulin resistance, contributes to the development of type 2 diabetes mellitus. In this study, we assessed whether peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) β/δ prevented ER stress-associated inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells.

Methods Studies were conducted in mouse C2C12 myotubes, in the human myogenic cell line LHCN-M2 and in skeletal muscle from wild-type and PPAR β/δ -deficient mice and mice exposed to a high-fat diet.

Results The PPAR β/δ agonist GW501516 prevented lipid-induced ER stress in mouse and human myotubes and in skeletal muscle of mice fed a high-fat diet. PPAR β/δ activation also prevented thapsigargin- and tunicamycin-induced ER stress in human and murine skeletal muscle cells. In agreement with this, PPAR β/δ activation prevented ER stress-associated inflammation and insulin resistance, and glucose-intolerant PPAR β/δ -deficient mice showed increased phosphorylated levels of inositol-requiring 1 transmembrane kinase/endonuclease-1 α in skeletal muscle. Our findings demonstrate that PPAR β/δ activation prevents ER stress through the activation of AMP-activated protein kinase (AMPK), and the subsequent inhibition of extracellular-signal-regulated kinase (ERK)1/2 due to the inhibitory crosstalk between AMPK and ERK1/2, since overexpression of a dominant negative AMPK construct (K45R) reversed the effects attained by PPAR β/δ activation.

Conclusions/interpretation Overall, these findings indicate that PPAR β/δ prevents ER stress, inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells by activating AMPK.

Keywords

AMPK, ER stress, ERK1/2, NF- κ B, PPAR β/δ

Abbreviations

2-DG	2-Deoxy-glucose
ACC2	Acetyl-CoA carboxylase 2
AMPK	AMP-activated protein kinase
ATF6	Activating transcription factor-6
eIF2 α	Eukaryotic initiation factor 2 α
EMSA	Electrophoretic mobility shift assay

ER	Endoplasmic reticulum
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
I κ B	Inhibitor of κ B
IRE-1 α	Inositol-requiring 1 transmembrane kinase/endonuclease-1 α
NF- κ B	Nuclear factor- κ B
PERK	Eukaryotic translation initiation factor-2 α kinase 3
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
UPR	Unfolded protein response
XBP1	X-box binding protein-1

Introduction

Insulin resistance, defined as a decrease in the action of insulin on target tissues [1], precedes and predicts the development of type 2 diabetes mellitus [2]. The primary site of insulin resistance in obesity and type 2 diabetes mellitus is skeletal muscle, since it accounts for the majority of insulin-stimulated glucose utilisation [3].

Recently, endoplasmic reticulum (ER) stress has emerged as a key player in the progression of insulin resistance and intersects with many different inflammatory and stress signalling pathways that disrupt insulin signalling [4]. The ER is responsible for the synthesis, folding and trafficking of secretory and membrane proteins. Disruption of ER homeostasis results in an adaptive unfolded protein response (UPR), intended to restore the ER's folding capacity and mitigate stress [5]. However, if ER stress is activated chronically, a decline in the action of insulin occurs, thus contributing to the development of type 2 diabetes mellitus [6]. Initiation of the canonical UPR involves activation of three key signalling proteins—inositol-requiring 1 transmembrane kinase/endonuclease-1 α (IRE-1 α), activating transcription factor-6 (ATF6) and eukaryotic translation initiation factor-2 α kinase 3 (PERK). The endoribonuclease activity of IRE-1 α cleaves a 26-base-pair segment from the mRNA of *XBP1*, creating the active (or spliced) form of the transcription factor *XBP1* (*sXBP1*). ATF6 translocates to the nucleus, in which it acts as a transcription factor and PERK phosphorylates and inhibits an essential initiator of translation, eukaryotic initiation factor 2 α (eIF2 α). Together, these pathways work to decrease translation and increase protein folding [7]. The three branches of the canonical UPR intersect with a variety of inflammatory and stress signalling systems, including the nuclear factor- κ B (NF- κ B) pathway [4], the activation of which has been linked with the impairment of insulin action in skeletal muscle [8]. Thus, phosphorylation of eIF2 α by PERK results in a general repression of mRNA translation.

Since inhibitor of κ B (I κ B), which inhibits NF- κ B, has a shorter half-life than NF- κ B, UPR activation shifts the I κ B/NF- κ B ratio, thereby releasing NF- κ B, which translocates to the nucleus and increases the expression of its target genes, such as *IL6* and *TNF*[9]. In addition, in response to ER stress, the cytoplasmatic domain of phosphorylated IRE1 α can recruit TNF- α receptor-associated factor 2, forming a complex that interacts and activates I κ B kinase, leading to NF- κ B activation [9].

Activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) exhibits multiple protective effects, including inhibition of inflammation and insulin resistance, and reduces the risk of developing type 2 diabetes mellitus [10]. Recently, it has been reported that AMPK activation protects against hypoxic injury [11], atherosclerosis [12,13] and lipid-induced hepatic disorders [14] by reducing ER stress. Interestingly, an inhibitory crosstalk between AMPK and extracellular-signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) has been reported [15] and inhibition of ERK1/2 was found to improve AMPK and Akt pathways and to reverse ER stress-induced insulin resistance in skeletal muscle cells [16].

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are members of the nuclear receptor superfamily of ligand-inducible transcription factors [17] that may also suppress inflammation through diverse mechanisms [18–21]. Of the three PPAR isotypes found in mammals, PPAR α [22] and PPAR γ are the targets for fibrates and thiazolidinediones, respectively. Activation of the third isotype, PPAR β/δ , has been proposed as a potential treatment for insulin resistance [23] since it enhances fatty acid catabolism in adipose tissue and skeletal muscle [24,25]. In fact, it has been reported that the increase in fatty acid oxidation in human skeletal muscle cells following treatment with the PPAR β/δ activator GW501516 is dependent on both PPAR β/δ and AMPK [26]. The present study was undertaken to determine whether PPAR β/δ prevents inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells by reducing ER stress.

Methods

Cell culture and mice Mouse C2C12 (ATCC, Manassas, VA) and human LHCN-M2 myoblasts were maintained, grown and differentiated to myotubes as previously described [27]. Lipid-containing media were prepared by conjugation of palmitic acid with fatty-acid-free BSA, as previously described [27]. For further details, please refer to the electronic supplementary material (ESM) Methods.

Five-week-old CD-1 male mice (Harlan Ibérica, Barcelona, Spain) were randomly distributed into three experimental groups ($n=8$ each). One group was fed the standard diet, another was fed a

western-type high-fat diet (HFD; 35% fat by weight, 58% energy from fat; Harlan Ibérica) plus one daily oral gavage of vehicle (0.5% wt/vol. carboxymethylcellulose) and the other was fed the HFD plus one daily oral dose of 3 mg kg⁻¹ day⁻¹ of the PPAR β/δ agonist GW501516 dissolved in the vehicle. After 3 weeks of treatment, mice were killed under isoflurane anaesthesia. Skeletal muscle (gastrocnemius) samples were frozen in liquid nitrogen and then stored at -80°C.

Male *Ppar β/δ* (also known as *Ppard*)-knockout mice and control mice (*Ppar β/δ ^{+/+}*, wild-type) with the same genetic background (C57BL/6X129/SV), each having an initial weight of 20–25 g, were fed a standard diet. The generation of *Ppar β/δ* -null mice has been described previously [28]. 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.

RNA preparation and quantitative RT-PCR The relative levels of specific mRNAs were assessed by RT-PCR, as previously described [27]. Primer sequences used for RT-PCR are displayed in ESM Table 1.

Immunoblotting Isolation of total and nuclear extracts was performed as described elsewhere [27]. For further details, please refer to the ESM Methods.

Deoxy-D-glucose, 2-[1,2-³H(N)] uptake experiments 2-Deoxy-glucose (2-DG) uptake was performed as previously reported [27]. For further details, please refer to the ESM Methods.

Electrophoretic mobility shift assay An electrophoretic mobility shift assay (EMSA) was performed as previously described [27].

HPLC measurement of AMP The measurement of AMP using HPLC was performed as previously described [27]. For further details, please refer to the ESM Methods.

Statistical analyses Results are expressed as means \pm SD. Significant differences were established by one-way ANOVA using the GraphPadInstat programme (GraphPad Software V5.01; GraphPad Software, San Diego, CA). When significant variations were found by one-way ANOVA, the Tukey–Kramer multiple comparison post-hoc test was performed. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results

PPAR β/δ activation prevents lipid-induced ER stress in mouse and human skeletal muscle cells To evaluate the effects of PPAR β/δ activation on palmitate-induced ER stress in skeletal muscle cells we first examined the effects of GW501516, a selective ligand for PPAR β/δ [29,30], on activated IRE1 α . Palmitate exposure at 0.5 mmol/l induced an increase in the phosphorylated forms of IRE1 α detected by slower migration, and this increase was almost completely prevented by treatment with GW501516 (Fig. 1a). Consistent with the increase in the phosphorylation status of IRE1 α , which promotes the splicing of *Xbp1*, C2C12 myotubes exposed to 0.5 mmol/l palmitate showed increased spliced *Xbp1* (*sXbp1*) mRNA levels compared with cells exposed only to BSA (Fig. 1b), whereas in the presence of palmitate plus GW501516 the *sXbp1* mRNA levels were reduced. This effect of GW501516 was specific and PPAR β/δ dependent, since it was reversed by the PPAR β/δ antagonist GSK0660. In human LHCN-M2 myotubes (Fig. 1c) a similar trend was observed in *sXBPI* mRNA levels, indicating that the effect of GW501516 was not species specific. A similar profile of changes was observed when we examined the mRNA levels of several ER stress markers such as *Grp78/Bip* (also known as *Hspa5*), *Grp94* (also known as *Hsp90b1*) and *Orp150* (also known as *Hyou1*). Exposure to palmitate increased the expression of all these ER stress markers, whereas co-incubation with palmitate plus GW501516 led to a significant reduction (Fig. 1d–f). Next, we evaluated whether PPAR β/δ activation protected against lipid-induced ER stress in vivo in skeletal muscle. We have previously reported that mice fed with an HFD were glucose-intolerant, whereas mice fed with the HFD and treated with GW501516 showed an improved response to glucose challenge [31]. In the skeletal muscle of these mice we observed that exposure to the HFD increased the phosphorylated forms of IRE1 α and the protein levels of BIP compared with those in mice fed a standard diet, while these changes were prevented in HFD-fed mice treated with GW501516 (Fig. 1g,h). Therefore, the improvement in glucose tolerance achieved by GW501516 in mice fed an HFD was accompanied by a reduction in the levels of ER stress markers in skeletal muscle.

PPAR β/δ activation prevents thapsigargin- and tunicamycin-induced ER stress in skeletal muscle cells To clearly demonstrate that PPAR β/δ activation prevents ER stress in skeletal muscle cells, we then examined the effects of GW501516 on ER stress induced by thapsigargin, a potent ER stress inducer [32]. Thapsigargin elicited a huge increase in IRE1 α protein levels, and GW501516 reduced the increase in the phosphorylated forms of this protein (Fig. 2a). Consistent with the effects of GW501516 on IRE1 α , drug treatment downregulated the increase caused by

thapsigargin in *sXbp1* transcript levels in murine (Fig. 2b) and human myotubes (Fig. 2c). GW501516 also significantly reduced the increase in the expression of other ER stress markers such as *CHOP* and *ATF3* in human myotubes (Fig. 2d,e). Similarly, GW501516 significantly reduced the increase in mRNA levels in human (*CHOP* and *ATF3*) (Fig. 2f,g) and murine (*Chop*, *Grp94* and *Orp150*) (Fig. 2 h–j) myotubes caused by another potent ER stress inducer, tunicamycin [31]. Overall, these findings demonstrate that PPAR β/δ activation prevents ER stress regardless of the inducer used.

PPAR β/δ activation prevents ER stress-induced inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells Given the association of ER stress with activation of the inflammatory process and insulin resistance [4,6], we next assessed whether PPAR β/δ activation reduced ER stress-associated inflammation and insulin resistance. First, we examined the NF- κ B pathway. Thapsigargin reduced the protein levels of the NF- κ B inhibitor I κ B α [33] (Fig. 3a), whereas co-incubation of the cells with thapsigargin plus GW501516 led to an increase in the levels of this NF- κ B inhibitor. Also, thapsigargin increased nuclear p65 subunit of NF- κ B and co-incubation of the cells with thapsigargin plus the GW501516 prevented this increase (Fig. 3b). To clearly determine whether GW501516 prevented ER stress-induced inflammation, we measured NF- κ B binding activity by EMSA. NF- κ B formed one main complex with nuclear proteins (Fig. 3c). Specificity of the DNA-binding complex was assessed in competition experiments by adding an excess of unlabelled NF- κ B oligonucleotide. NF- κ B binding activity increased in nuclear extracts from thapsigargin- and tunicamycin-treated human cells, whereas in those cells co-incubated with these ER stressors and GW501516 the binding activity was similar to that in control cells. Addition of an antibody against the p65 and p50 subunits of NF- κ B in thapsigargin-stimulated cells supershifted the complex, indicating that this band mainly consisted of these subunits. No supershift was observed after addition of an Oct-1 antibody, indicating that the NF- κ B changes were specific. We then evaluated the effect of GW50156 on the expression of Tnf- α and IL-6, cytokines under the transcriptional control of NF- κ B and which are also involved in insulin resistance [34,35]. Consistent with the NF- κ B findings, *Tnf* mRNA levels were increased in C2C12 cells exposed to thapsigargin and *Il6/IL6* mRNA levels were increased in murine and human myotubes exposed to tunicamycin; co-incubation with GW501516 significantly reduced the expression of these cytokines (Fig. 3 d–f).

In an attempt to establish a relationship between PPAR β/δ and ER stress-induced insulin resistance we used *Ppar β/δ* -knockout mice. Interestingly, the PPAR β/δ -deficient mice showed

glucose intolerance compared with wild-type mice (Fig. 4a) accompanied by an increase in the phosphorylated levels of IRE1 α in skeletal muscle (Figure 4b). Moreover, in myotubes exposed to tunicamycin, we observed a reduction in insulin-stimulated Akt phosphorylation, which is consistent with the findings of previous studies (16,27,36). In cells co-incubated with tunicamycin plus GW501516 this effect was significantly reversed (Fig. 4c). Similarly, when we evaluated the protein levels of the insulin receptor β -subunit, which are reduced by defective insulin signalling [37], we observed a strong decrease following tunicamycin exposure; this response was attenuated by GW501516 (Fig. 4d). In concordance with these changes, tunicamycin reduced insulin-stimulated 2-DG uptake, whereas co-incubation with tunicamycin plus GW501516 restored a significant part of this reduction (Fig. 4e). Overall, these findings demonstrate that PPAR β/δ activation prevents ER stress-induced inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells.

PPAR β/δ modulates the crosstalk between AMPK and ERK pathways in skeletal muscle cells To assess the mechanism by which PPAR β/δ inhibits ER stress, we focused on the potential activation of AMPK by this nuclear receptor. AMPK, a pharmacological target for insulin resistance and type 2 diabetes mellitus [10], inhibits ER stress [11,12,14,16] and its reduction promotes ER stress [13]. Interestingly, an inhibitory crosstalk between AMPK and ERK1/2 has been reported [15,16] and inhibition of ERK1/2 improves AMPK and Akt signalling and reverses ER stress-induced insulin resistance in skeletal muscle cells [16]. To ascertain whether the effect of PPAR β/δ on ER stress involves this inhibitory crosstalk between AMPK and ERK1/2, we first examined the effects of the ER stressor tunicamycin on their phosphorylated protein levels. As shown in Fig. 5a,b, tunicamycin reduced phospho-AMPK and increased phospho-ERK1/2 levels, which is in agreement with findings of previous studies [16] and suggests the presence of the inhibitory crosstalk between these kinases under our conditions. In addition, when cells were exposed to tunicamycin plus GW501516 or the MEK inhibitor U0126, the phosphorylation status of AMPK was increased compared with that in cells only exposed to tunicamycin (Fig. 5c). These findings suggest that GW501516 might inhibit ERK1/2 through AMPK activation. Confirmation of the involvement of PPAR β/δ in ERK1/2 inhibition was supported by in vivo findings: skeletal muscle from PPAR β/δ -deficient mice showed increased phospho-ERK1/2 levels compared with wild-type mice (Fig. 5d). Moreover, exposure to an HFD increased phospho-ERK1/2 levels in skeletal muscle, whereas treatment of the HFD-fed mice with GW501516 reversed this increase (Fig. 5e). Likewise, when we analysed phospho-AMPK levels in the skeletal muscle of these mice we observed a trend in changes opposite to those observed for ERK1/2 (Fig. 5f).

PPAR β/δ prevents ER stress-induced inflammation and insulin resistance through an AMPK-dependent mechanism Because AMPK is activated allosterically by an increase in the intracellular AMP/ATP ratio [10], we measured adenine nucleotide concentrations in C2C12 cells to further investigate the underlying mechanism of GW501516 in AMPK activation. GW501516 significantly increased the AMP/ATP ratio (Fig. 6a), suggesting that this mechanism was responsible for the increase in AMPK activity following drug treatment. As a control for AMPK activity we measured phosphorylation of acetyl-CoA carboxylase 2 (ACC2), a substrate for AMPK [10]. In accordance with an increase in AMPK activity, ACC2 phosphorylation was increased following GW501516 treatment (Fig. 6b). In addition, our findings showed that the preventive effects of GW501516 on palmitate-induced ER stress in C2C12 myotubes were AMPK-dependent, since the reduction in *sXBP1* mRNA levels induced by GW501516 was reversed by the AMPK inhibitor compound C (Fig. 6c). Next, to confirm the involvement of AMPK in the effects of PPAR β/δ , we overexpressed an AMPK α subunit with a point mutation that causes the enzyme to function as a dominant negative suppressor of endogenous AMPK activity (K45R). Overexpression of this construct in C2C12 cells leads to the displacement of endogenous subunits, followed by degradation of the free α subunit [38]. Inhibition of AMPK activity attenuated the effect of GW501516 in tunicamycin-exposed cells on I κ B α protein levels (Fig. 6d), insulin-stimulated Akt phosphorylation (Fig. 6e) and IR β protein levels (Fig. 6f), suggesting that PPAR β/δ activation prevents ER stress-associated inflammation and insulin resistance through AMPK.

Discussion

Excessive ER stress contributes to the development of insulin resistance and type 2 diabetes mellitus [4,6]. Therefore, reduction of ER stress may be critical in preventing these chronic metabolic diseases. Findings from our study suggest that PPAR β/δ activation prevents ER stress-induced inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells and that some of the diabetes-protective and anti-inflammatory effects of the PPAR β/δ ligands might be due to their ability to reduce ER stress. Interestingly, the increase in ER stress markers in the skeletal muscle of *Ppar β/δ* -null mice indicates that this nuclear receptor offers protection against ER stress in this tissue, suggesting that a reduction in the activity of this nuclear receptor can exacerbate ER stress and its associated metabolic complications. Indeed, genetic variation in the *PPAR β/δ* gene predicts the conversion from impaired glucose tolerance to type 2 diabetes mellitus [39].

We have previously reported that PPAR β/δ activation prevented palmitate-induced inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells by increasing fatty acid oxidation in skeletal muscle cells [40]. Increased fatty acid oxidation following PPAR β/δ activation has also been reported to contribute to the reduction in palmitate-induced ER stress in pancreatic beta cells [41]. It has also been reported that PPAR β/δ activation prevents ethanol-induced ER stress in the liver [42] and in the aorta of high-fat, high-cholesterol-fed mice [43], although the mechanisms responsible for these effects have not been identified. In the present study we showed that PPAR β/δ activation prevents lipid-induced ER stress in vitro and in vivo in skeletal muscle cells, where the reported increase in fatty acid oxidation after PPAR β/δ activation may contribute to these effects. However, our data also demonstrate that PPAR β/δ activation prevents ER stress induced by potent ER stressors (either tunicamycin or thapsigargin), suggesting that the protective effect of PPAR β/δ on ER stress extends beyond increased fatty acid oxidation. In fact, our data show that PPAR β/δ activation inhibits ER stress through a mechanism involving AMPK activation. Targeting AMPK to prevent ER stress is consistent with previous studies reporting that AMPK activation reduces ER stress [11–14, 27]. Our findings also indicate that AMPK activation attained by PPAR β/δ activators is the result of an increase in the AMP/ATP ratio, which is in agreement with findings of previous studies [26,31].

The findings of this study point to an additional mechanism by which PPAR β/δ activation may contribute to the increase in AMPK activity and the reduction in ER stress. This mechanism involves the inhibition of the ERK1/2 signalling pathway by PPAR β/δ . An inhibitory crosstalk exists between the AMPK and ERK1/2 pathways [15,16] and recently it has been shown that ERK1/2 inhibition results in enhanced AMPK activity and prevention of ER stress-induced insulin resistance in myotubes [16]. In fact, ER stress significantly increases ERK1/2 phosphorylation in myotubes ([16] and this study), whereas ERK1/2 inhibition restores AMPK and insulin-stimulated Akt phosphorylation caused by ER stress [16]. Our data demonstrate that PPAR β/δ activation prevents HFD-induced ERK1/2 phosphorylation and exhibits a trend to restore phospho-AMPK levels in skeletal muscle. These data suggest that PPAR β/δ regulates the inhibitory crosstalk between AMPK and ERK1/2 elicited by an HFD, causing an imbalance of this crosstalk in favour of AMPK, which prevents ER stress. The finding that *Ppar* β/δ -null mice show increased phospho-ERK1/2 levels in skeletal muscle clearly demonstrates that PPAR β/δ inhibits this pathway. This result is interesting since ERK1/2 is a potential drug target for preventing metabolic derangements. Thus, targeting ERK1/2 could protect obese mice against insulin resistance and liver steatosis by decreasing adipose tissue inflammation and increasing muscle glucose uptake [44].

In summary, on the basis of our findings we propose that PPAR β/δ prevents ER stress-associated inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells through AMPK activation.

Acknowledgements

We thank A. Orozco (Department of Biochemistry and Molecular Biology of the University of Barcelona, Spain) for experimental assistance with human myotube cultures. We thank M.J. Birnbaum (Howard Hughes Medical Institute, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA) for the pcDNA3/pAMPK α 2-K45R plasmid.

Funding

This study was partly supported by funds from the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2009-06939 and SAF2012-30708) and the European Union ERDF. CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM) is an Instituto de Salud Carlos III project. LS was supported by an FPI grant from the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad. We thank the University of Barcelona's Language Advisory Service for revising the manuscript.

Contribution statement

LS, EB, AMG-F, XP, LM, WW and MV-C processed the samples, analysed and prepared the data and were involved in drafting the article. LS, EB, AG-F, XP, LM and WW contributed to the interpretation of the data and revised the article. MV-C and LS designed the experiments and analysed and interpreted the data. MV-C wrote the manuscript and is responsible for the integrity of the work as a whole. All authors approved the final version of the manuscript.

Duality of interest

The authors declare that there is no duality of interest associated with this manuscript.

References

1. Samuel VT, Shulman GI (2012) Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell* 148: 852-871
2. Martin BC, Warram JH, Krolewski AS, Bergman RN, Soeldner JS, Kahn CR (1992) Role of glucose and insulin resistance in development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25-year follow-up study. *Lancet* 340: 925-929

3. Kelley DE, Goodpaster BH, Storlien L (2002) Muscle triglyceride and insulin resistance. *Annu Rev Nutr* 22: 325-346
4. Hotamisligil GS (2010) Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell* 140: 900-917
5. Ron D (2002) Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *J Clin Invest* 110: 1383-1388
6. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, et al. (2004) Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 306: 457-461
7. Eizirik DL, Cardozo AK, Cnop M (2008) The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Endocr Rev* 29: 42-61
8. Itani SI, Ruderman NB, Schmieder F, Boden G (2002) Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and I κ B- α . *Diabetes* 51: 2005-2011
9. Zhang K, Kaufman RJ (2008) From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* 454: 455-462
10. Zhang BB, Zhou G, Li C (2009) AMPK: an emerging drug target for diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metab* 9: 407-416
11. Terai K, Hiramoto Y, Masaki M, et al. (2005) AMP-activated protein kinase protects cardiomyocytes against hypoxic injury through attenuation of endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol* 25: 9554-9575
12. Dong Y, Zhang M, Wang S, et al. (2010) Activation of AMP-activated protein kinase inhibits oxidized LDL-triggered endoplasmic reticulum stress in vivo. *Diabetes* 59: 1386-1396
13. Dong Y, Zhang M, Liang B, et al. (2010) Reduction of AMP-activated protein kinase α 2 increases endoplasmic reticulum stress and atherosclerosis in vivo. *Circulation* 121: 792-803
14. Wang Y, Wu Z, Li D, et al. (2011) Involvement of oxygen-regulated protein 150 in AMP-activated protein kinase-mediated alleviation of lipid-induced endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* 286: 11119-11131
15. 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. *Biochem Biophys Res Commun* 368: 402-407
16. Hwang SL, Jeong YT, Li X, et al. (2013) Inhibitory cross-talk between the AMPK and ERK pathways mediates endoplasmic reticulum stress-induced insulin resistance in skeletal muscle. *Br J Pharmacol* 169: 69-81

17. Michalik L, Auwerx J, Berger JP, et al. (2006) International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol Rev* 58: 726-741
18. Lee CH, Chawla A, Urbiztondo N, et al. (2003) Transcriptional repression of atherogenic inflammation: modulation by PPARdelta. *Science* 302: 453-457
19. Pascual G, Fong AL, Ogawa S, et al. (2005) A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. *Nature* 437: 759-763
20. Daynes RA, Jones DC (2002) Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 2: 748-759
21. Devchand PR, Keller H, Peters JM, Vazquez M, Gonzalez FJ, Wahli W (1996) The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature* 384: 39-43
22. Auwerx J, Baulieu E, Beato M, et al. (1999) A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell* 97: 161-163
23. Schuler M, Ali F, Chambon C, et al. (2006) PGC1alpha expression is controlled in skeletal muscles by PPARbeta, whose ablation results in fiber-type switching, obesity, and type 2 diabetes. *Cell Metab* 4: 407-414
24. Lee CH, Olson P, Hevener A, et al. (2006) PPARdelta regulates glucose metabolism and insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103: 3444-3449
25. Barish GD, Narkar VA, Evans RM (2006) PPAR delta: a dagger in the heart of the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 116: 590-597
26. Krämer DK, Al-Khalili L, Guigas B, Leng Y, Garcia-Roves PM, 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
27. Salvadó L, Coll T, Gómez-Foix AM, et al. (2013) Oleate prevents saturated-fatty-acid-induced ER stress, inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells through an AMPK-dependent mechanism. *Diabetologia* 56: 1372-1382
28. Nadra K, Anghel SI, Joye E, et al. (2006) Differentiation of trophoblast giant cells and their metabolic functions are dependent on peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta. *Mol Cell Biol* 26: 3266-3281
29. Oliver WR Jr, Shenk JL, Snaith MR, 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
30. Kino T., Rice KC, Chrousos GP (2007) The PPAR β/δ agonist GW501516 suppresses interleukin 6-mediated hepatocyte acute phase reaction via STAT3 inhibition. *Eur J Clin Invest* 37: 425-433.

31. Barroso E, Rodríguez-Calvo R, Serrano-Marco L, et al. (2011) The PPAR β/δ activator GW501516 prevents the down-regulation of AMPK caused by a high-fat diet in liver and amplifies the PGC-1 α -Lipin 1-PPAR α pathway leading to increased fatty acid oxidation. *Endocrinology* 152: 1848-1859
32. Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC (2005) Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* 115: 2656-2664
33. Weigert C, Brodbeck K, Staiger H, et al. (2004) Palmitate, but not unsaturated fatty acids, induces the expression of interleukin-6 in human myotubes through proteasome-dependent activation of nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem*;279:23942-23952.
35. Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G (2001) Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J PhysiolEndocrinol.Metab* 280: E745-E751
36. Pickup JC, Mattock MB, Chusney GD, Burt D (1997) NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. *Diabetologia* 40: 1286-1292
37. Hage Hassan R, Hainault I, Vilquin JT, et al. (2012) Endoplasmic reticulum stress does not mediate palmitate-induced insulin resistance in mouse and human muscle cells. *Diabetologia* 55: 204-214
38. Liang CP, Han S, Okamoto H, et al. (2004) Increased CD36 protein as a response to defective insulin signaling in macrophages. *J Clin Invest* 113: 764-773
39. Mu J, Brozinick JT, Valladares O, Bucan M, Birnbaum MJ (2001) A role for AMP-activated protein kinase in contraction- and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle. *Mol Cell* 7: 1085-1094
40. Andrulionyte L, Peltola P, Chiasson JL, Laakso M, STOP-NIDDM Study Group (2006) Single nucleotide polymorphisms of PPARD in combination with the Gly482Ser substitution of PGC-1A and the Pro12Ala substitution of PPARG2 predict the conversion from impaired glucose tolerance to type 2 diabetes: the STOP-NIDDM trial. *Diabetes* 55: 2148-2152
41. Coll T, Alvarez-Guardia D, Barroso E, 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: 1560-1569
42. Cao M, Tong Y, Lv Q, et al. (2012) PPAR δ Activation RESCUES PANcreatic β -cell line INS-1E from palmitate-induced endoplasmic reticulum stress through enhanced fatty acid oxidation. *PPAR Res.* 2012: 680684

43. Ramirez T, Tong M, Chen WC, Nguyen QG, Wands JR, de la Monte SM (2013) Chronic alcohol-induced hepatic insulin resistance and endoplasmic reticulum stress ameliorated by peroxisome-proliferator activated receptor- δ agonist treatment. *J GastroenterolHepatol.* 28: 179-187
44. Bojic LA, Burke AC, Chokker SS, et al. (2014) Peroxisome Proliferator-Activated Receptor δ agonist GW1516 attenuates diet-induced aortic inflammation, insulin resistance, and atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor knockout mice. *ArteriosclerThrombVasc Biol* 34: 52-60.
45. Jager J, Corcelle V, Grémeaux T, et al. (2011) Deficiency in the extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK1) protects leptin-deficient mice from insulin resistance without affecting obesity. *Diabetologia* 54: 180-189.

Figure legends

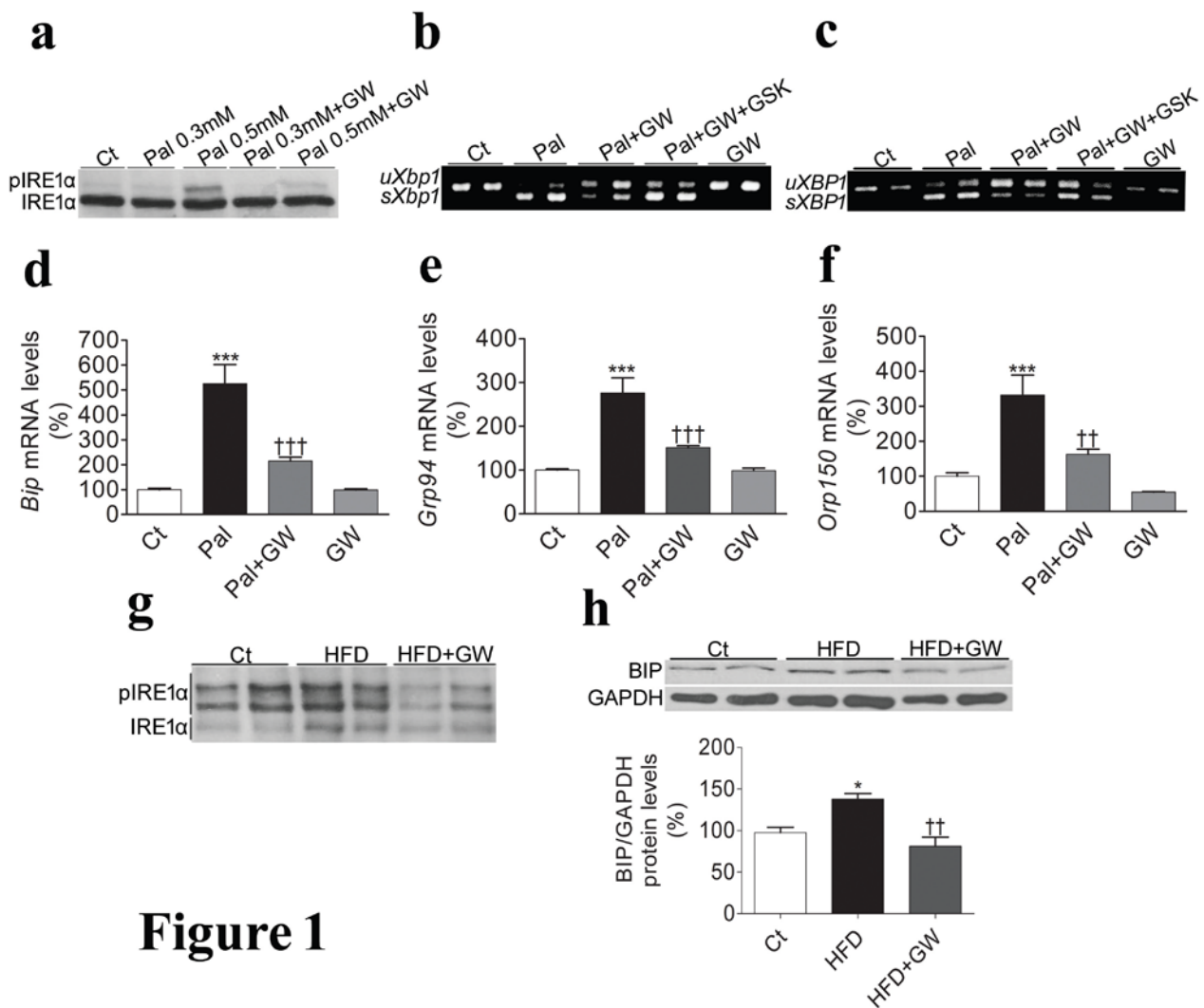


Figure 1

Fig. 1 PPAR β/δ activation prevents lipid-induced ER stress in skeletal muscle cells. C2C12 or LHCN-M2 myotubes were incubated for 16 h in the absence (Ct, Control) or presence of palmitate (Pal) (0.3 or 0.5 mmol/l for C2C12 and 0.25 mmol/l for LHCN-M2) with or without pretreatment (before palmitate exposure) with 10 μ mol/l GW501516 (GW) for 24 h or with 10 μ mol/l GSK0660 (GSK) for 30 min. **(a)** Cell lysates from C2C12 cells exposed to BSA (Ct) or to 0.3 mmol/l or 0.5 mmol/l Pal were subjected to western blot analysis with antibody against IRE-1 α . **(b, c)** sXbp1 mRNA levels in C2C12 **(b)** and LHCN-M2 **(c)** myotubes. **(d–f)** mRNA levels of Bip **(d)**, Grp94 **(e)** and Orp150 **(f)** in C2C12 myotubes. **(g, h)** Skeletal muscle lysates from mice fed a standard chow diet (Ct) or an HFD with or without GW (3 mg kg⁻¹ day⁻¹) were subjected to western blot analysis with antibodies against IRE1 α **(g)** and BIP **(h)**. *** p <0.001 and * p <0.05 vs control; ††† p <0.001 and †† p <0.01 vs palmitate-exposed cells or HFD-exposed mice. sXBP1: spliced XBP1. uXBP1: unspliced XBP1.

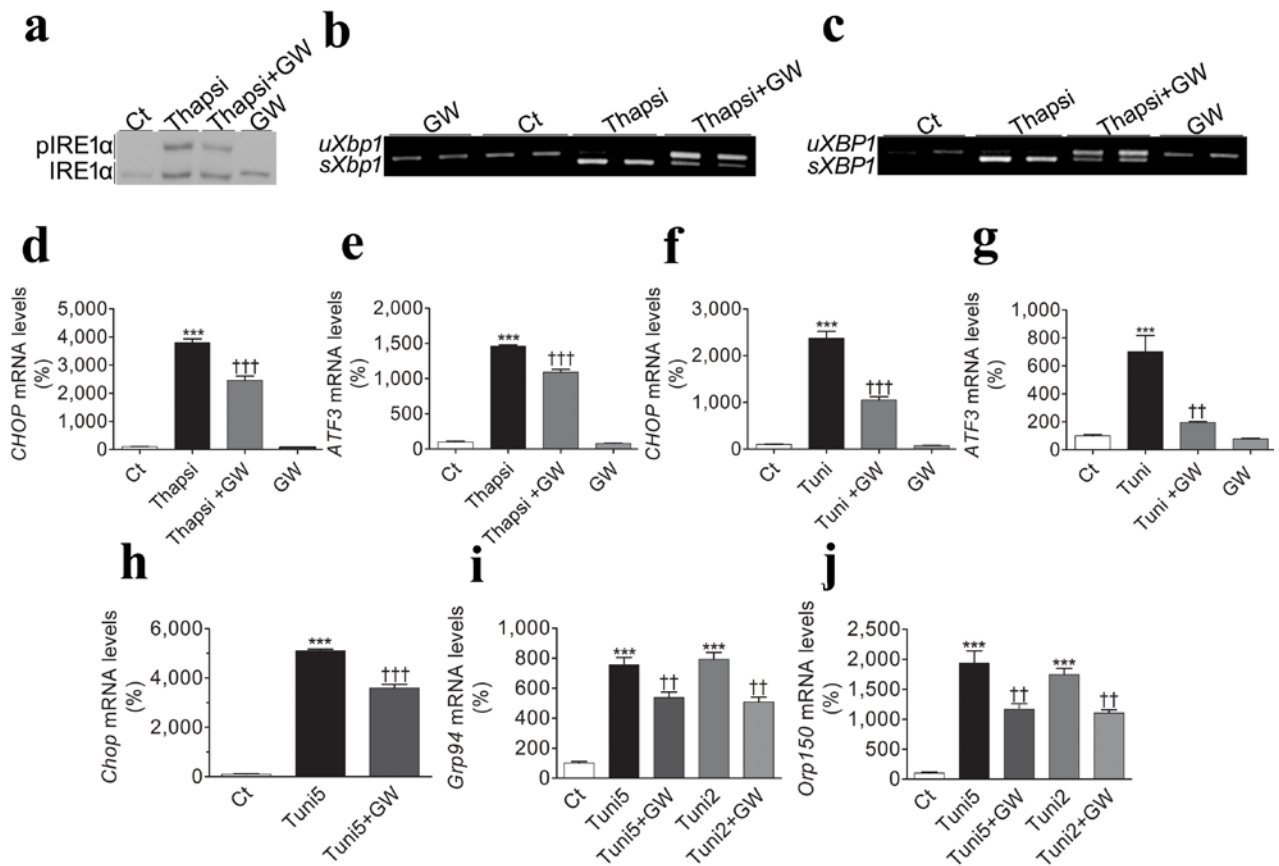


Figure 2

Fig. 2 PPAR β/δ activation prevents thapsigargin- and tunicamycin-induced ER stress in myotubes. C2C12 or LHCN-M2 myotubes were incubated for 16 h in the absence (Ct, Control) or presence of thapsigargin (Thapsi) (1 $\mu\text{mol/l}$ for C2C12 and 100 nmol/l for LHCN-M2) or 2 or 5 $\mu\text{g/ml}$ tunicamycin (Tuni) with or without pretreatment with 10 $\mu\text{mol/l}$ GW501516 (GW) for 24 h. **(a)** Cell lysates were subjected to westernblot analysis with antibody against IRE-1 α . **(b, c)** mRNA levels of *sXbp1* in C2C12 **(b)** and LHCN-M2 **(c)** myotubes. **(d–g)** mRNA levels of *CHOP* **(d, f)** and *ATF3* **(e, g)** in LHCN-M2 myotubes exposed to 100 nmol/l Thapsi **(d, e)** or 2 $\mu\text{g/ml}$ Tuni **(f, g)** with or without pretreatment with 10 $\mu\text{mol/l}$ GW for 24 h. **(h–j)** mRNA levels of *Chop* **(h)**, *Grp94* **(i)** and *Orp150* **(j)** in C2C12 myotubes exposed to 2 or 5 $\mu\text{g/ml}$ Tuni with or without pretreatment with 10 $\mu\text{mol/l}$ GW for 24 h. *** $p < 0.001$ vs control; †† $p < 0.01$ and ††† $p < 0.001$ vs Thapsi- or Tuni-treated cells. sXBP1: spliced XBP1. uXBP1: unspliced XBP1.

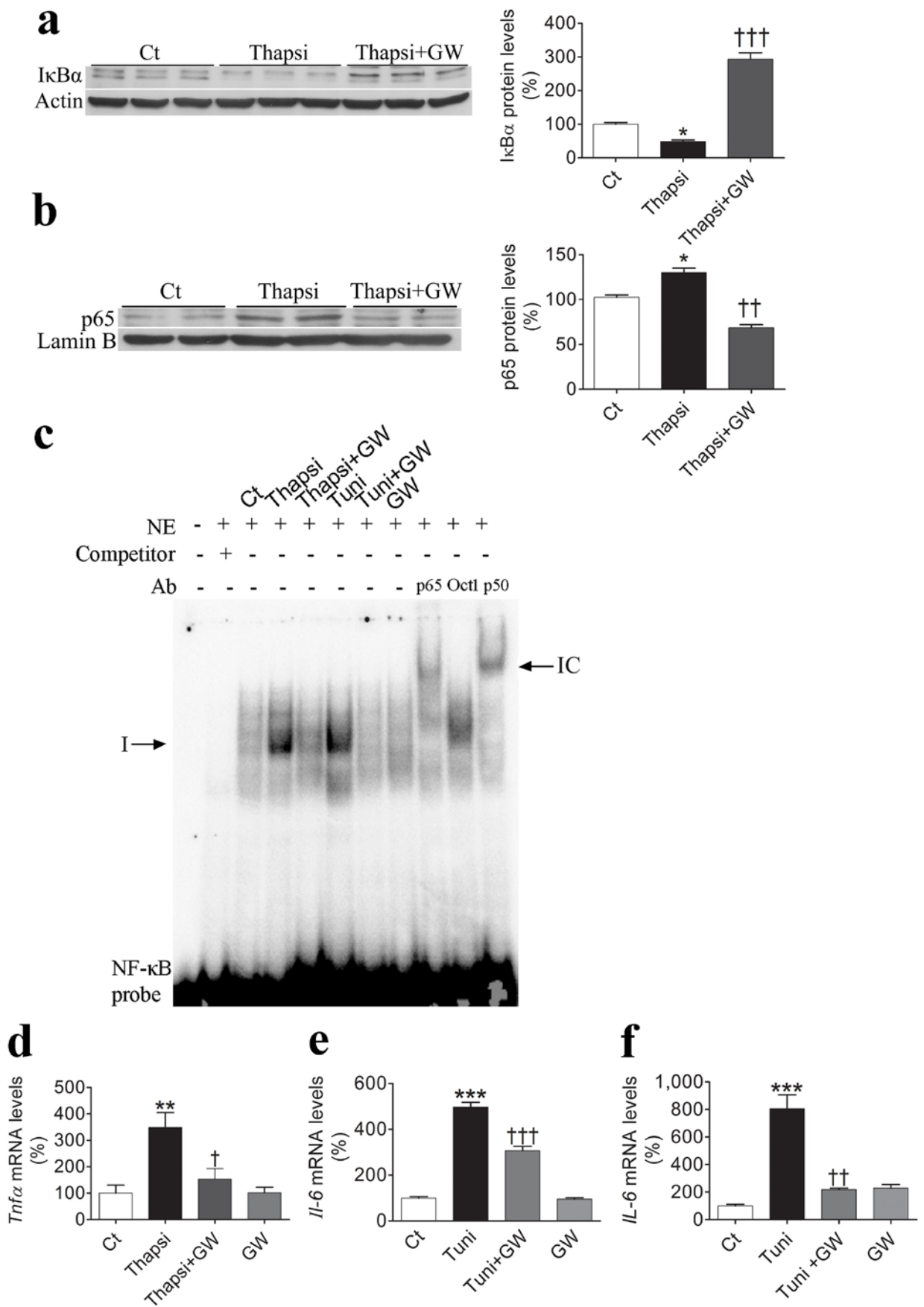


Figure 3

Fig. 3 PPAR β/δ activation prevents ER stress-induced inflammation in skeletal muscle cells. C2C12 or LHCN-M2 myotubes were incubated for 16 h or 2 h (EMSA) in the absence (Ct, Control) or presence of 1 μ mol/l thapsigargin (Thapsi) or 2 μ g/ml tunicamycin (Tuni) with or without pretreatment with 10 μ mol/l GW501516 (GW) for 24 h. **(a, b)** Cell lysates were subjected to western blot analysis with antibody against I κ B α **(a)** or the p65 subunit of NF- κ B **(b)**. The graphs represent the quantification of the normalised protein levels expressed as a percentage of control samples \pm SD. **(c)** Autoradiograph of EMSA performed with a 32 P-labelled NF- κ B nucleotide and crude nuclear protein extract (NE) from LHCN-M2 myotubes. One main specific complex (I) based on competition with a molar excess of unlabelled probe is shown. The supershift immune complex (IC) obtained by incubating NE with an antibody (Ab) directed against the p65 and p50 subunits of NF- κ B is also shown. **(d–f)** mRNA levels of *Tnf* **(d)** and murine *Il6* **(e)** and human *IL6* **(f)**. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs control; $^{\dagger}p < 0.05$, $^{\dagger\dagger}p < 0.01$ and $^{\dagger\dagger\dagger}p < 0.001$ vs Thapsi- or Tuni-treated cells

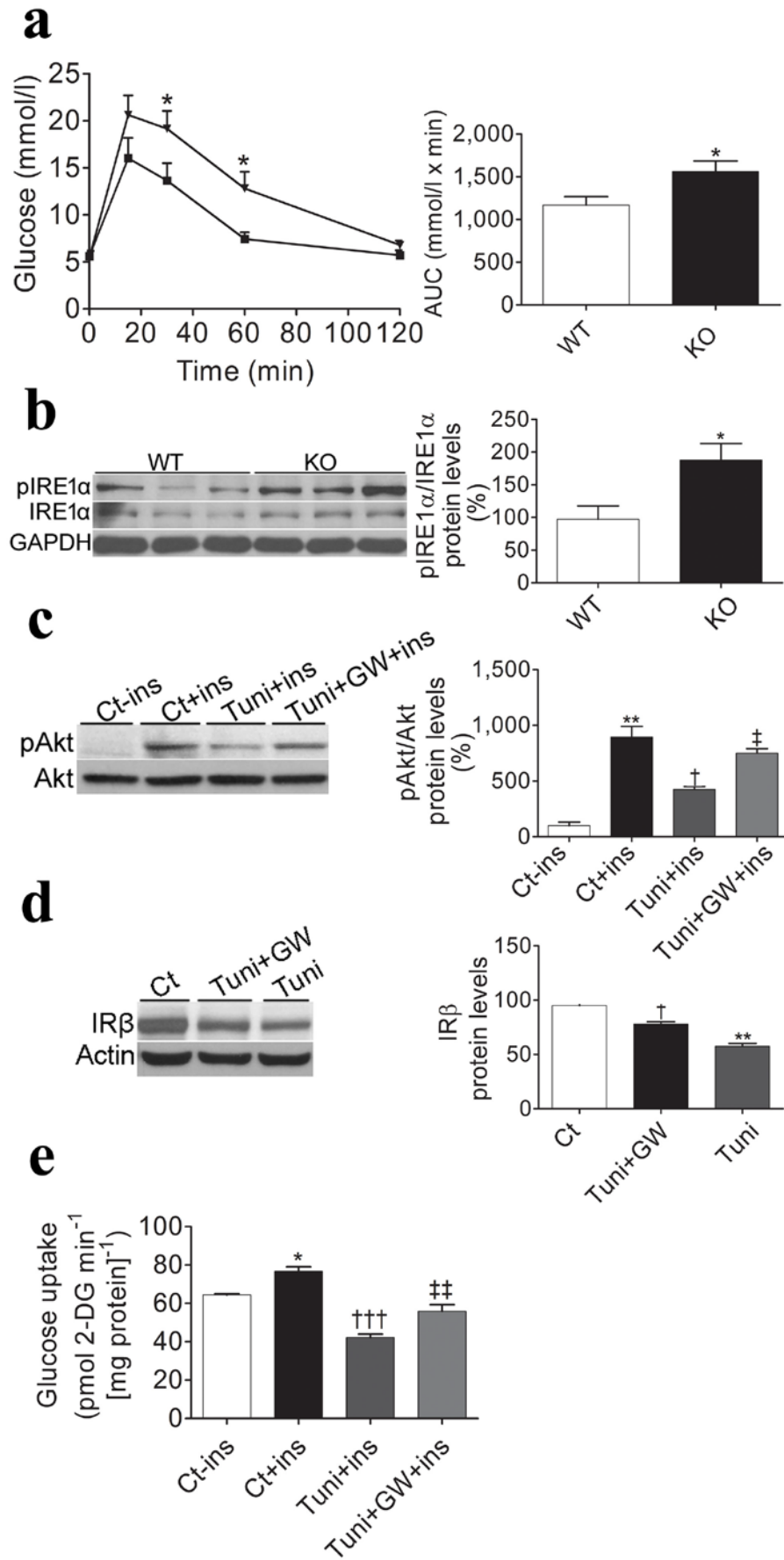


Figure 4

Fig. 4 PPAR β/δ activation prevents ER stress-induced insulin resistance in skeletal muscle cells. (a) Glucose tolerance test (and AUC) in wild-type (WT) and *Ppar β/δ* -null (KO) mice. Data are expressed as means \pm SD ($n=9$ mice per group). (b) Skeletal muscle cell lysates from WT and KO mice were subjected to western blot analysis with antibodies against total and phospho-IRE-1 α . (c–e) C2C12 myotubes were incubated for 16 h in the absence (Ct, Control) or the presence of 0.5 μ g/ml tunicamycin (Tuni) with or without pretreatment with 10 μ mol/l GW501516 (GW) for 24 h. When indicated, cells were incubated with 100 nmol/l insulin (Ins) for the last 10 min. C2C12 cell lysates were subjected to western blot analysis with antibodies against total and phospho-Akt (Ser473) (c) and insulin receptor β -subunit (IR β) (d). 2-DG uptake was assessed without or with insulin (e). * $p<0.05$ and ** $p<0.01$ vs WT mice, control cells or control cells not exposed to insulin; † $p<0.05$ and †† $p<0.001$ vs insulin-stimulated control cells or cells incubated with tunicamycin; ‡ $p<0.05$ and ‡‡ $p<0.01$ vs insulin-stimulated cells incubated with tunicamycin

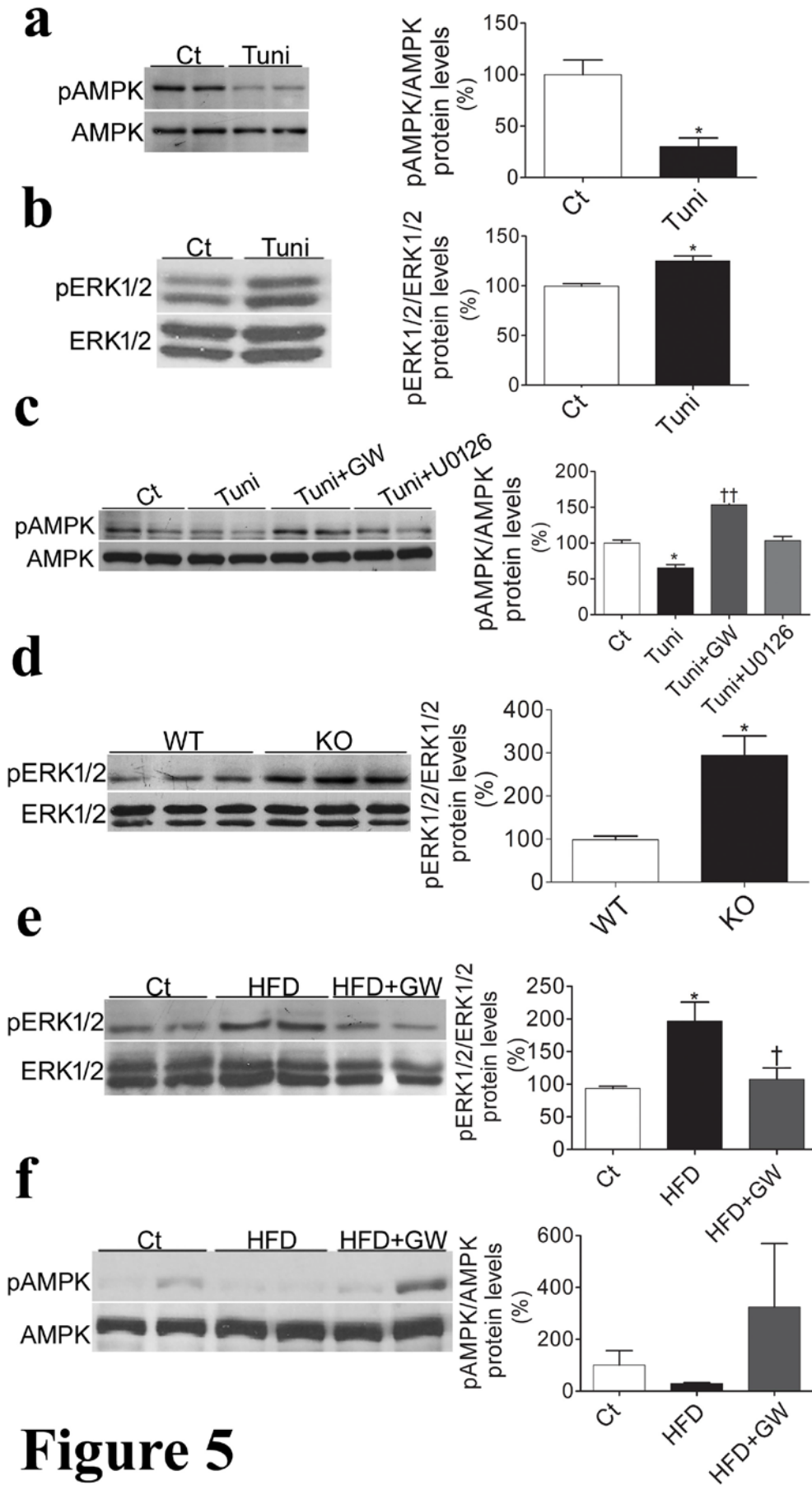


Figure 5

Fig. 5 PPAR β/δ modulates the crosstalk between AMPK and ERK pathways in skeletal muscle cells. C2C12 myotubes were incubated for 16 h in the absence (Ct, Control) or presence of 5 $\mu\text{g/ml}$ tunicamycin (Tuni) with or without pretreatment with 10 $\mu\text{mol/l}$ GW501516 (GW) or 10 $\mu\text{mol/l}$ U0126 for 24 h. (a–c) C2C12 cell lysates subjected to western blot analysis with antibodies against total and phospho-AMPK (Thr¹⁷²) (a,c) and total and phospho-ERK1/2 (b). (d) Skeletal muscle cell lysates from wild-type (WT) and *Ppar β/δ* -null (KO) mice were subjected to western blot analysis with antibodies against total and phospho-ERK1/2. (e, f) Skeletal muscle lysates from mice fed a standard chow diet (Ct) or an HFD with or without GW501516 (3 mg kg⁻¹ day⁻¹) were subjected to western blot analysis with antibodies against total and phospho-ERK1/2 (e) and total and phospho-AMPK (f). * $p < 0.05$ vs control cells, WT mice or mice fed with chow diet; † $p < 0.05$ and †† $p < 0.01$ vs Tuni-exposed cells or mice fed an HFD

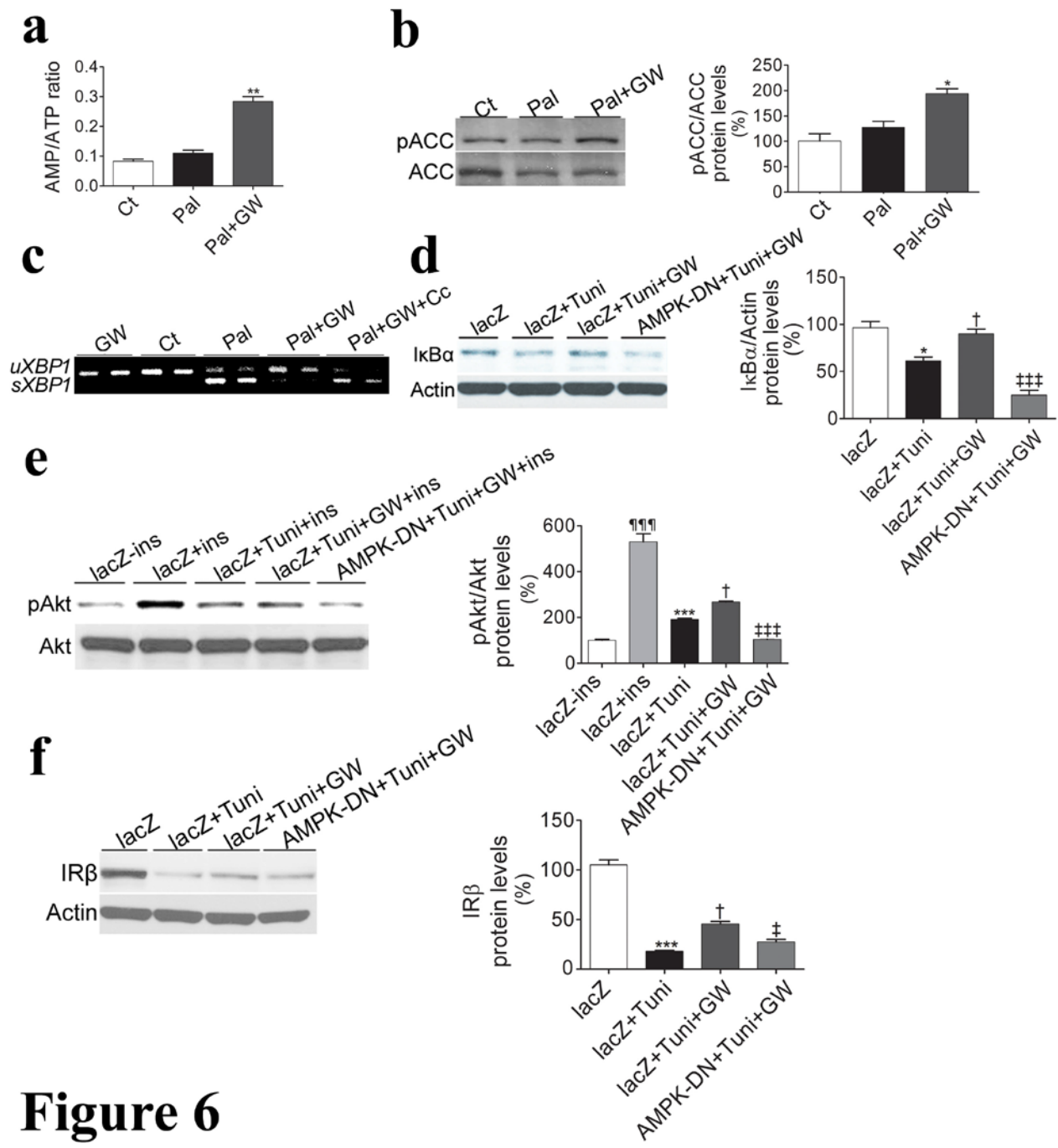


Figure 6

Fig. 6 PPAR β/δ prevents ER stress through an AMPK-dependent mechanism. **(a)** AMP/ATP ratio in C2C12 myotubes incubated for 16 h in the absence (Ct, Control) or presence of 0.5 mmol/l palmitate (Pal) with or without pretreatment with 10 μ mol/l GW501516 (GW) for 24 h. **(b)** Cell lysates were subjected to westernblot analysis with antibodies against total and phospho-ACC2. * p <0.05 and ** p <0.001 vs cellsexposed topalmitate alone. **(c)** *sXBP1* mRNA levels in LHCN-M2 myotubes incubated for 16 h in the absence (Ct, Control) or presence of 0.25 mmol/l Pal with or without pretreatment with 10 μ mol/l GW or 10 μ mol/l compound C (Cc) for 24 h. **(d–f)** C2C12 myotubes transfected with LacZ- or pAMPK α 2 K45R-carrying plasmids (AMPK-DN) were incubated for 16 h in the absence (Ct, Control) or presence of 0.5 μ g/ml tunicamycin (Tuni) with or without pretreatment with 10 μ mol/l GW. Cell lysates were subjected to westernblot analysis with antibodies against I κ B α **(d)** total and phospho-Akt (Ser⁴⁷³) **(e)** and IR β **(f)**. When indicated, cells were incubated with 100 nmol/l insulin (Ins) for the last 10 min. Data are expressed as mean \pm SD. * p <0.05 and *** p <0.001 vsLacZ cells, LacZ+Ins-treated cells; \dagger p <0.05 vsTuni-exposed cells; \ddagger p <0.05 and $\ddagger\ddagger$ p <0.001 vs cells co-incubated with Tuniplus GW; $\text{\textcircled{S}}$ p <0.001 vs LacZ cells not exposed to Ins

Electronic supplementary material (ESM)-Methods

Cell culture and mice Mouse C2C12 myoblasts (ATCC) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin (10.000 units/ml of penicillin and 10.000 µg/ml of streptomycin). When cells reached confluence, the medium was switched to the differentiation medium containing DMEM and 2% horse serum, which was changed every other day. After four additional days, the differentiated C2C12 cells had fused into myotubes. Lipid-containing media were prepared by conjugation of palmitic acid with fatty acid-free bovine serum albumin, as previously described [1]. Following incubation, RNA or protein were extracted from myotubes as described below.

The human myogenic cell line LHCN-M2 was grown in DMEM:Medium 199 (4:1) supplemented with 15% FBS, 16 mM HEPES, 30 ng/ml zinc sulphate, 1.4 µg/ml vitamin B12, 55 ng/ml dexamethasone, 5 ng/ml hepatocyte growth factor and 2.5 ng/ml fibroblast growth factor. To induce differentiation to myotubes, when cells reached 80-90% confluence the medium was changed to DMEM: Medium 199 (4:1) supplemented with 0.5% FBS, 20 mmol/l HEPES, 10 µg/ml insulin, 100 µg/ml apo-transferrin and 55 ng/ml dexamethasone for two days, and then to DMEM:Medium 199 (4:1) supplemented with 0.5% FBS, 20 mmol/l HEPES and 55 ng/ml dexamethasone for three additional days [1].

Mice were maintained under standard conditions of illumination (12-h light/dark cycle) and temperature (21±1°C), and were fed a standard diet before the studies began. Food and water were provided ad libitum. The research complied with 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.

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, 15, 30, 60 and 120 minutes.

The research complied with 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.

Immunoblotting To obtain total proteins, myotubes were homogenized in RIPA lysis buffer (Sigma) with 5 mmol/l NaF, 1 mmol/l phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 mmol/l sodium orthovanadate and 5.4 µg/mL aprotinin at 4°C for 30 min. The homogenate was centrifuged at 17,000 g for 30 min at 4°C. Protein concentration was measured by the Bradford method. Total proteins (30 µg) were separated by SDS-PAGE on 10% separation gels and transferred to Immobilon polyvinylidene difluoride membranes (Millipore, Bedford, MA). In the case of IRE-1α a phos-tag gel was used as previously described [1]. Western blot analysis was performed using antibodies against total and phospho-Akt (Ser⁴⁷³), total and phospho-AMPK (Thr¹⁷²), total and phospho-ACC2, total and phospho-ERK1/2 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴), GRP78/BiP, IRE-1α, H2B, insulin receptor β-subunit (IRβ) (Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA), IκBα, p65 (Santa Cruz) and actin (Sigma). Detection was achieved using the Western Lightning® Plus-ECL chemiluminescence kit (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). The equal loading of proteins was assessed by Ponceau S staining. The size of proteins detected was estimated using protein molecular-mass standards (Bio-Rad).

Deoxy-D-glucose,2-[1,2-³H(N)] uptake experiments Cells were starved for 24 h and washed twice with HEPES buffer (20 mmol/l HEPES [pH 7.4], 140 mmol/l NaCl, 2.5 mmol/l MgSO₄, 5 mmol/l KCl, 1 mM CaCl₂). Cells were preincubated with HEPES buffer for 1 h and incubated for 30 min in the presence or absence of 100 nmol/l insulin, followed by treatment with deoxy-D-glucose,2-[1,2-³H(N)] (37,000 Bq/ml; Amersham Biosciences) for 20 min. The uptake was

stopped by adding 10 $\mu\text{mol/l}$ cytochalasin B. After washing with ice-cold 0.9% NaCl three times, cells were lysed with 0.1 mol/l NaOH. Non-specific uptake was measured in the presence of 10 $\mu\text{mol/l}$ cytochalasin B and was subtracted from all the values.

High Performance Liquid Chromatography Measurement of 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 mmol/l potassium dihydrogen phosphate, pH 6, containing 4 mmol/l tetrabutylammonium hydrogen sulphate 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.

1. Salvadó L, Coll T, Gómez-Foix AM, Salmerón E, Barroso E, Palomer X, Vázquez-Carrera M (2013) Oleate prevents saturated-fatty-acid-induced ER stress, inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells through an AMPK-dependent mechanism. *Diabetologia* 56: 1372-1382

DISCUSSIÓ

Nombrosos estudis corroboren l'existència d'una relació entre, per una banda, l'obesitat i els estats inflamatoris crònics de baixa intensitat i, per altra, l'aparició de RI (Wellen i Hotamisligil, 2005; Qatanani i Lazar, 2007; Glass i Olefky, 2012). En aquest sentit, cal destacar que tant la ingesta de dietes riques en àcids grassos com l'elevada taxa lipolítica del teixit adipós visceral (Tchernof i Després, 2013), contribueixen a incrementar els AGL circulants que juguen un paper clau en la patogènia dels processos inflamatoris que precedeixen la RI (Barbarroja i col., 2010). Un dels processos pel qual l'increment dels AGL circulants pot produir inflamació i RI en persones obeses és l'estrès del RE (Lee i Ozcan, 2014, Hotamisligil, 2010; Garg i col., 2012). Atès que el múscul esquelètic és el principal teixit responsable de la captació de glucosa dependent d'insulina (Klip i Pâquet, 1990), s'ha proposat que l'acumulació de lípids en aquest teixit, s'associa estretament amb l'aparició d'estrès del RE (Peng i col., 2011), així com amb l'activació de vies inflamatòries que precedeixen la RI (Shulman, 2000; Wellen i Hotamisligil, 2005).

Model *in vitro* d'estrès del RE, inflamació i RI: cèl·lules de múscul esquelètic murines (C2C12) i humanes (LHCN-M2) exposades a tapsigargina, tunicamicina i palmitat.

Estudis previs havien demostrat que dietes riques en greixos saturats condueixen a estats de RI (Hu i col., 2001), fins al punt que l'AG saturat palmitat s'ha relacionat estretament amb l'activació de les vies inflamatòries que precedeixen la RI (Jové i col., 2006; Coll i col., 2008). Recentment, diferents autors han proposat que el palmitat també és capaç d'induir estrès del RE en múscul esquelètic (Peng i col., 2011; Hage Hassan i col., 2012; Rieusset i col., 2012) (**Figura 1**). En línia amb aquests estudis, en els nostres experiments l'addició de palmitat a miotubs murins i humans durant 16 hores, va incrementar els nivells d'expressió gènica de diversos marcadors d'estrès del RE, tals com *sXBP1*, *ATF3*, *CHOP*, així com els nivells de fosforilació d'IRE1 α . Aquests resultats ens van confirmar que en les nostres condicions experimentals, miotubs C2C12 i LHCN-M2 incubats amb palmitat són un bon model *in vitro* per tal d'aprofundir en el coneixement de l'estrès del RE. Cal destacar que en els treballs presentats en aquesta tesi doctoral també s'ha utilitzat el model de cèl·lules C2C12 i LHCN-M2 incubades amb coneguts i potents inductors d'estrès del RE tals com la tunicamicina i la tapsigargina, els quals van incrementar notablement els nivells d'expressió gènica d'*ATF3* i *CHOP*, així com els nivells de fosforilació d'IRE1 α en ser incubats durant 16h en miotubs humans i murins. Aquests compostos han demostrat ser potents inductors d'estrès del RE, fins el punt que Hwang i col. (2013) van demostrar que en els seus experiments la tapsigargina i la tunicamicina van induir

estrès del RE a partir de les 2 i 3 hores d'incubació en miotubs L6, respectivament (**Figura 2**).

Estudis realitzats per Coll i col. (2010b) van demostrar que el palmitat incrementava els nivells d'expressió gènica d'*Il-6* i *Tnf α* passades 8 hores i 16 hores d'incubació en cèl·lules C2C12, respectivament. Macrae i col. (2013) van voler aprofundir en l'estudi dels mecanismes responsables de l'activació de les vies inflammatòries induïdes pel palmitat en cèl·lules musculars esquelètiques i van concloure que aquest retard era degut al temps que es requeria per acumular els intermediaris lipídics derivats del palmitat responsables del procés inflamatori. En aquest sentit, estudis previs realitzats pel nostre grup de recerca van demostrar que l'addició de palmitat a cèl·lules C2C12 durant 16 hores afavoria l'acumulació del mateix en forma de DAG, responsable de l'activació de la PKC θ i, conseqüentment de les vies inflammatòries que precedeixen la RI (Coll i col., 2008). En línia amb aquests estudis, en incubar els miotubs murins amb palmitat durant 16 hores, aquest va reduir els nivells de fosforilació d'AKT en residus de Ser⁴⁷³, inhibint així la via de senyalització de la insulina. D'aquesta manera podem afirmar que miotubs C2C12 incubats amb palmitat són un bon model per tal d'induir RI.

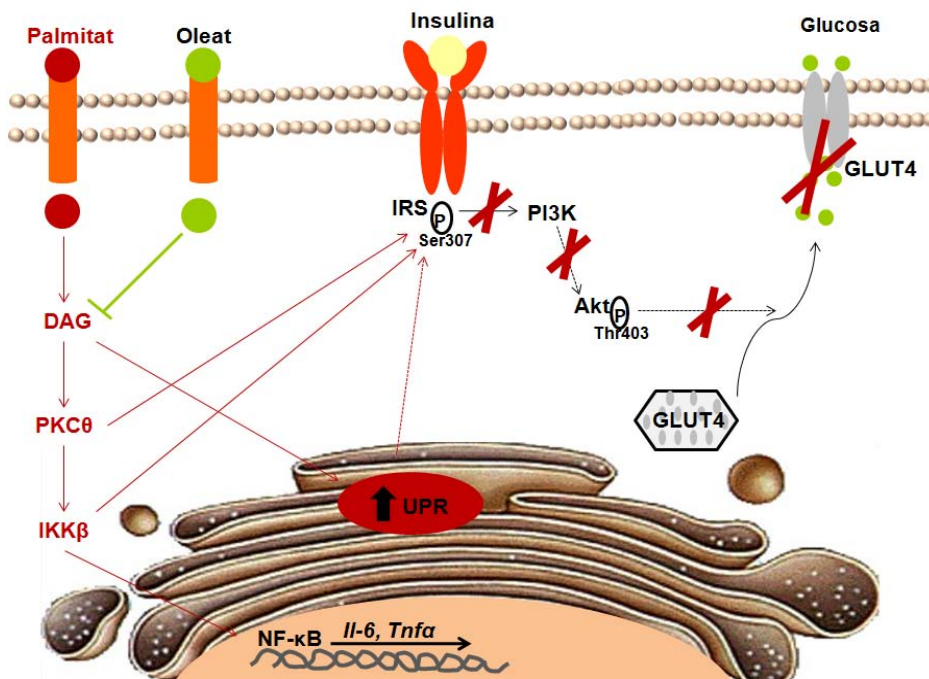


Figura 1. El palmitat dona lloc a l'activació de vies inflamatòries, estrès del RE i RI en múscul esquelètic. Ara bé, l'oleat no només no dona lloc a aquests processos sinó que és capaç d'evitar els efectes produïts pel palmitat (Jové i col., 2006; Coll i col., 2008; Peng i col., 2011).

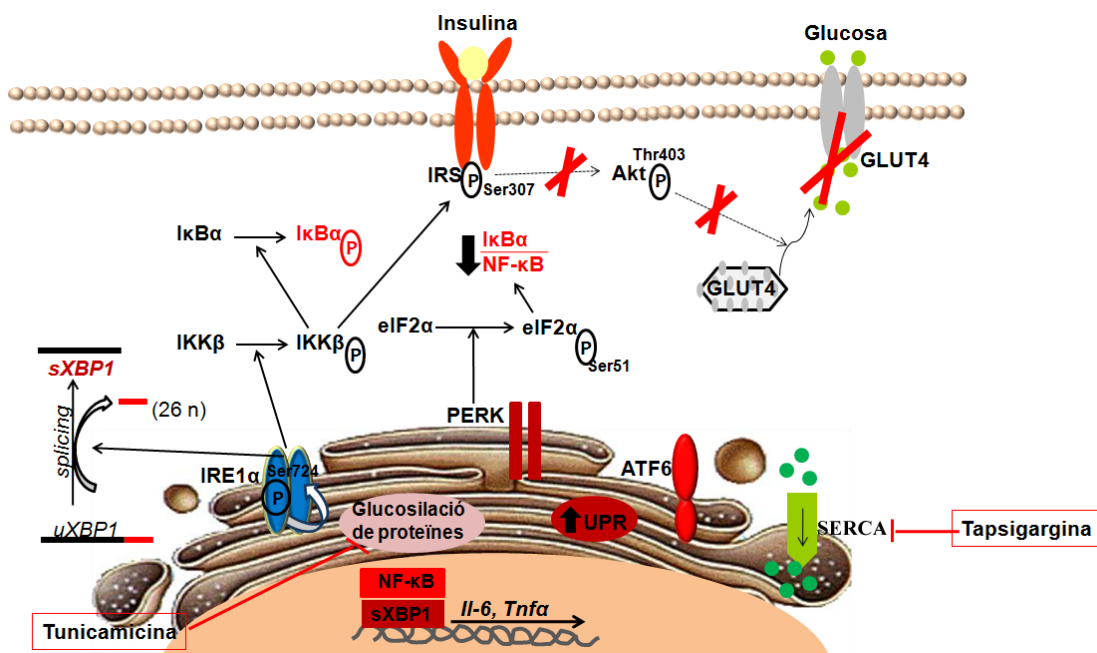


Figura 2. La tapsigargina i la tunicamicina inhibeixen l'entrada de calci al lumen del RE i la glucosilació de proteïnes, respectivament. Així, aquests compostos activen la UPR responsable de l'aparició de RI en múscul esquelètic (Hage Hassan i col., 2012), així com de l'activació de vies inflamatòries en pàncrees, fetge, teixit adipós i macròfags (Garg i col., 2012).

I. L'oleat evita l'estrès del RE, la inflamació i la RI induïda per l'AG saturat palmitat en cèl·lules de múscul esquelètic mitjançant un mecanisme que involucra l'AMPK.

Actualment molts estudis fomenten la dieta mediterrània caracteritzada per ser l'oli d'oliva la principal font de lípids (Bergouignan i col., 2009; Doménech i col., 2014; Mayneris-Perxachs i col., 2014), fins al punt que un estudi recent realitzat per Salas-Salvadó i col. (2014) ha destacat la importància d'aquest oli en la prevenció de la DM2. El principal component de l'oli d'oliva és l'AG monoinsaturat oleat el qual, tot i presentar un ampli ventall d'efectes beneficiosos, no se'n coneixen amb exactitud els mecanismes moleculars responsables (Bergouignan i col., 2009).

L'acumulació dels AG saturats en forma de lípids complexos, com el DAG (Itani i col., 2002) i les ceramides (Summers i col., 2006), en múscul esquelètic condueix a l'activació de les vies inflamatòries. Hu i col. (2011) van demostrar que l'oleat evitava l'acumulació de ceramides induïda pel palmitat en múscul esquelètic, mentre que estudis previs realitzats en el nostre laboratori assenyalaven que l'oleat, a diferència del palmitat, s'acumulava en forma de TG i inclús evitava l'acumulació del palmitat en forma de DAG en miotubs murins gràcies a la seva capacitat per a incrementar l'oxidació del palmitat. Per tant, un dels mecanismes responsables dels efectes antiinflamatoris i antidiabètics de l'oleat (Coll i col., 2008), semblaven implicar la reducció de l'acumulació de lípids complexos. Malgrat aquests resultats, quan vam inhibir l'oxidació dels àcids grassos, els efectes de l'oleat no van desaparèixer totalment, fet que suggeria que altres mecanismes estaven implicats.

En els últims anys, nombrosos investigadors s'han centrat en l'estudi de l'estrès del RE per tal d'aprofundir en el coneixement dels mecanismes moleculars responsables de l'aparició de processos inflamatoris i de RI (Hotamisligil, 2010). Així doncs, en aquest estudi vam voler esbrinar si els efectes antiinflamatoris i antidiabètics de l'oleat es podien explicar en part per la capacitat d'aquest AG de regular les vies moleculars activades en resposta a l'estrès del RE.

En primer lloc, per tal de demostrar que l'estrès del RE donava lloc a inflamació i RI en el nostre model, vam incubar els miotubs amb tunicamicina i taspigargina i vam observar un marcat increment dels nivells d'expressió gènica d'*Il6*, així com una reducció dels nivells de fosforilació d'AKT induïda per insulina, respectivament. A més, en els nostres experiments també vam demostrar que l'estrès del RE causat pel palmitat era responsable de la inhibició de la via de senyalització de la insulina, ja que l'inhibidor d'estrès del RE PBA va recuperar els nivells de fosforilació d'AKT reduïts pel

palmitat. Contràriament als nostres resultats, estudis previs havien descartat la possibilitat de què l'estrès del RE causat pel palmitat fos el responsable de la RI produïda per aquest AG (Hage Hassan i col., 2012; Rieusset i col., 2012). En aquests estudis Hage Hassan i col. (2011) van incubar els miotubs amb una concentració de palmitat un 50% superior a la utilitzada en els nostres estudis, fet que podria explicar que en els seus experiments el PBA no fos capaç de reduir la RI induïda pel palmitat. En canvi, Peng i col. (2011) van confirmar la nostra hipòtesi en demostrar que l'estrès del RE induït per una concentració de 0,5 mM de palmitat era el responsable de la RI en miotubs C2C12. D'aquesta manera, atès que l'estrès del RE induït pel palmitat precedia la RI en el nostre model cel·lular, el principal objectiu del nostre estudi va ser elucidar si l'oleat exercia els seus efectes antiinflamatoris i antidiabètics mitjançant mecanismes que involucraven les vies moleculars activades en resposta a l'estrès del RE.

Primerament, cal destacar que l'oleat, a diferència del palmitat, no només no va induir estrès del RE en miotubs murins i humans, sinó que va evitar els efectes produïts pel palmitat fins al punt que va revertir completament l'increment en els nivells d'expressió gènica d'*Xbp1*, *Atf3*, *Chop*, *Hsp70* i *Bip* induïts per l'AG saturat, així com els nivells proteïcs de BIP. A més, cal destacar l'important paper de l'oleat a l'hora d'evitar l'estrès del RE ja que va ser capaç de reduir els nivells de fosforilació de la proteïna IRE1 α incrementats pel palmitat i fins i tot per la tunicamicina. Malgrat que Peng i col. (2011) ja havien demostrat prèviament la capacitat de l'oleat per revertir l'estrès del RE induït pel palmitat, el nostre estudi va confirmar aquest fet i va demostrar que aquests efectes no eren específics d'espècie, sinó que també s'observaven en cèl·lules humanes.

A continuació, vam voler elucidar quin era el mecanisme responsable dels efectes de l'oleat sobre l'estrès del RE. En primer lloc, cal destacar que aquests efectes no eren secundaris a l'impediment en l'entrada de palmitat a la cèl·lula, ja que Peng i col. (2011) havien demostrat que l'oleat no inhibia la captació de palmitat en cèl·lules C2C12. Així doncs, per intentar esbrinar com l'oleat evitava l'estrès del RE induït pel palmitat en múscul esquelètic, ens vam centrar en els efectes d'aquest AG descrits prèviament pel nostre grup de recerca. Tenint en compte que estudis realitzats per Coll i col. (2008) van demostrar que l'oleat evitava l'activació de la via DAG-PKC θ -NF- κ B mitjançant l'activació del receptor nuclear PPAR α , vam voler avaluar si aquest FT estava implicat en els efectes de l'oleat sobre l'estrès del RE. Encara que ha estat descrit que l'activació de PPAR α atenua l'estrès del RE induït per palmitat en cèl·lules

cardíacques humanes (Palomer i col., 2014), l'oleat no va revertir l'estrès del RE mitjançant l'activació d'aquest receptor. En efecte, la reducció en els nivells d'expressió gènica d'*sXbp1*, *Atf3* i *Chop* induïda per l'oleat a miotubs incubats amb palmitat, no va ser revertida per l'addició de l'antagonista de PPAR α GW6471.

Atès que l'oleat incrementa la transcripció de gens involucrats en el metabolisme oxidatiu en miotubs murins mitjançant un mecanisme que involucra la PKA (Coll i col., 2008), i que estudis previs ja havien demostrat la capacitat d'aquest AG per activar aquesta cinasa (Chang i col., 2000), vam voler estudiar si l'activació de la PKA podia explicar els efectes inhibitoris de l'oleat sobre l'estrès del RE. Els nostres resultats van demostrar que la inhibició farmacològica d'aquesta proteïna mitjançant l'H89 no incrementava els nivells d'*sXbp1* reduïts per l'oleat confirmant que, tot i que alguns autors apunten a la PKA com a inhibidor de l'estrès del RE en cèl·lules β pancreàtiques (Yusta i col., 2006), aquest no era el mecanisme responsable dels efectes de l'oleat sobre l'estrès del RE induït pel palmitat en el nostre model cel·lular. Considerant que estudis recents demostren que la PKA pot activar SIRT1 (Gerhart-Hines i col., 2011), i que aquesta sirtuïna regula negativament la UPR en casos de DM2 (Li i col., 2011), vam voler estudiar si SIRT1 estava involucrada en els efectes de l'oleat sobre l'estrès del RE. En els nostres experiments l'inhibidor de SIRT1 EX527 no va ser capaç d'evitar l'efecte de l'oleat sobre els nivells d'expressió gènica d'*Atf3* i *Chop*, confirmant que l'oleat no inhibia l'estrès del RE induït pel palmitat mitjançant mecanismes que involucraven SIRT1.

Estudis previs realitzats pel nostre grup de recerca van demostrar que la inhibició de l'oxidació d'AG mitjançant etomoxir revertia els efectes antiinflamatoris de l'oleat en miotubs murins incubats amb palmitat (Coll i col., 2008). Ara bé, en els nostres experiments, l'addició d'etomoxir tampoc va ser capaç d'evitar els efectes de l'oleat sobre els nivells d'expressió gènica d'*sXbp1*, suggerint que l'oleat no revertia l'estrès del RE induït pel palmitat mitjançant l'activació de processos oxidatius en múscul esquelètic.

Ha estat descrit que l'oleat és capaç d'activar PPAR β/δ en cèl·lules hepàtiques, millorant així la sensibilitat a la insulina (Wu i col., 2012). Tenint en compte aquests resultats i, a més, considerant que l'activació d'aquest FT evitava l'estrès del RE a nivell hepàtic (Ramirez i col., 2013) i en cèl·lules β pancreàtiques (Cao i col., 2012), vam voler avaluar si PPAR β/δ estava implicat en els efectes inhibitoris de l'oleat sobre l'estrès del RE. Malgrat que en el segon estudi presentat en aquesta tesi doctoral hem

demostrat que l'activació de PPAR β/δ és capaç d'evitar l'estrès del RE induït per palmitat, l'addició de l'antagonista de PPAR β/δ GSK0660 no va revertir els nivells d'expressió gènica d'*Atf3* i *sXbp1* reduïts per l'oleat, fet que descartava la implicació d'aquest FT en els efectes inhibitoris de l'oleat sobre l'estrès del RE. Per tal de descartar el paper dels PPAR en els efectes de l'oleat sobre l'estrès del RE en el nostre model cel·lular, vam addicionar l'antagonista de PPAR γ GW9662 a cèl·lules coincubades amb palmitat i oleat, i no vam observar canvis en els nivells d'expressió gènica d'*Atf3*, confirmant així que l'oleat revertia l'estrès del RE mitjançant mecanismes que no involucraven els PPAR.

D'altra banda, Gwiazda i col. (2009) han descrit que el palmitat dona lloc a estrès del RE en cèl·lules β pancreàtiques reduint els nivells de calci del lumen d'aquest orgànul. Tenint en compte aquests resultats, vam voler estudiar si alteracions en l'homeòstasi del calci conduïen a estrès del RE en el nostre model cel·lular. Així doncs, en incubar miotubs murins amb l'ionòfor calcimicina, vam confirmar que la mobilització del calci està implicada en l'estrès del RE en múscul esquelètic, tal com ja s'havia descrit prèviament en cèl·lules endotelials (Dong i col., 2010a). Considerant aquests resultats i altres que indicaven que l'oleat evitava la reducció dels dipòsits de calci intraluminals responsables de l'estrès del RE induït pel palmitat en cèl·lules hepàtiques (Wei i col., 2009), vam incubar els miotubs C2C12 amb palmitat i BAPTA-AM, un quelant del calci. Atès que no vam observar canvis en els nivells d'*sXbp1* i *Chop* en addicionar BAPTA-AM a cèl·lules incubades amb palmitat, vam descartar la possibilitat de que alteracions en l'homeòstasi del calci fossin les responsables de l'estrès del RE causat pel palmitat en miotubs murins.

Altres estudis han associat la cinasa ERK1/2 amb l'activació de vies inflamatòries per part del palmitat en múscul esquelètic (Green i col., 2011a), raó per la qual vam voler esbrinar la seva possible implicació en l'increment de l'estrès del RE induït per palmitat. Els resultats obtinguts en coincubar els miotubs amb palmitat i l'inhibidor d'ERK1/2 U0126 confirmaven que, tot i que els nivells d'expressió gènica d'*I κ -6* es veien reduïts, no es van modificar els nivells d'expressió gènica de marcadors d'estrès del RE. D'acord amb aquest fet, vam poder confirmar que ERK1/2 no participava en l'activació de l'estrès del RE per part del palmitat en cèl·lules musculars esquelètiques.

Nombrosos treballs han destacat el paper de l'AMPK a l'hora d'inhibir l'estrès del RE fins al punt que l'AMPK va protegir front la lesió per hipòxia en cor (Terai i col., 2005), l'aterosclerosi (Dong i col., 2010a) i el dany hepàtic (Wang i col., 2011b)

mitjançant la reducció de l'estrès del RE. Així doncs, tenint en compte que ha estat descrit que el palmitat redueix els nivells de fosforilació de l'AMPK (Wu i col., 2007b; Sun i col., 2008; Hickson-Bick i col., 2000) vam voler investigar si aquest era el mecanisme responsable de l'estrès del RE causat pel palmitat en el nostre model cel·lular. La reducció en els nivells d'expressió gènica de diferents marcadors d'estrès del RE induïda per activadors de l'AMPK (AICAR i A769662) en cèl·lules incubades amb palmitat ens va confirmar que aquesta cinasa jugava un paper clau a l'hora d'inhibir l'estrès del RE induït pel palmitat en miotubs murins. D'acord amb aquest fet, l'A769662 també va recuperar els nivells de fosforilació d'AKT induïts per la insulina i que eren reduïts pel palmitat, demostrant que l'activació de l'AMPK evitava tant l'estrès del RE com la RI en cèl·lules musculars esquelètiques exposades a palmitat. En línia amb els nostres resultats, estudis posteriors han confirmat el paper clau de la cinasa AMPK a l'hora d'evitar la RI induïda per l'estrès del RE en miotubs L6 (Jeong i col., 2013).

Seguidament vam voler comprovar si l'oleat prevenia l'estrès del RE ocasionat pel palmitat mitjançant mecanismes que involucraven la proteïna AMPK, de la mateixa manera que ho havien fet en els nostres experiments els activadors farmacològics d'aquesta cinasa. L'addició de l'inhibidor de l'AMPK compost C a miotubs murins va evitar els efectes de l'oleat sobre els nivells d'expressió gènica de diferents marcadors d'estrès del RE, fet que suggeria que l'efecte de l'oleat era dependent de l'activació de l'AMPK. A més, els nostres resultats van demostrar que aquests efectes no eren específics d'una espècie en concret, sinó que també tenien lloc en cèl·lules humanes.

Malgrat que Peng i col. (2011) van proposar que la capacitat de l'oleat per evitar l'acumulació dels AG en forma de DAG, prèviament descrita per Coll i col. (2008), era la responsable d'inhibir l'estrès del RE induït pel palmitat en múscul esquelètic, els nostres resultats assenyalaven a l'AMPK com a proteïna responsable d'aquest procés. Per tal d'estar segurs que aquesta cinasa era la responsable dels efectes de l'oleat sobre l'estrès del RE induït pel palmitat en cèl·lules musculars esquelètiques, vam dur a terme una estratègia genètica d'inhibició molecular d'aquesta proteïna. Així doncs, l'addició d'un plasmidi que contenia un mutant de l'AMPK α capaç de desplaçar l'AMPK endògena va incrementar els nivells de fosforilació d'IRE1 α , proteïna clau de la UPR activada en resposta a l'estrès del RE. D'aquesta manera, vam poder confirmar que l'oleat evitava l'estrès del RE induït pel palmitat mitjançant un mecanisme que involucrava l'AMPK en cèl·lules musculars esquelètiques.

Atès que estudis previs destaquen l'important paper de l'estrès del RE a l'hora d'activar processos inflamatoris (Hotamisligil, 2010) i, que en les nostres condicions experimentals la tunicamicina va donar lloc a una resposta inflamatòria inclús superior a la del palmitat, podríem suggerir que el grau d'activació de l'estrès del RE en el nostre model cel·lular defineix en gran part la resposta inflamatòria. Així doncs, per tal de comprovar la contribució de l'AMPK en els efectes de l'oleat sobre el procés inflamatori vam inhibir aquesta proteïna mitjançant el compost C en cèl·lules coincubades amb palmitat i oleat. Els resultats obtinguts confirmaven l'important paper de l'AMPK en els efectes antiinflamatoris de l'oleat, ja que el compost C va incrementar l'activitat del FT NF- κ B i, com a conseqüència, l'expressió i secreció d'IL-6. En línia amb aquests resultats, la inhibició molecular de l'AMPK també va evitar els efectes antiinflamatoris de l'oleat, fet que recolzava estudis previs que apuntaven a l'AMPK com a cinasa clau en la inhibició dels processos inflamatoris que involucraven el FT NF- κ B (Salminen i col., 2011).

Tenint en compte els resultats obtinguts en el nostre estudi, cal destacar que Green i col. (2011b) van demostrar que l'activitat d'NF- κ B era superior en el múscul de pacients obesos amb DM2 que no pas amb individus que no presentaven obesitat. A més, l'activació de l'AMPK en el múscul d'aquests pacients va inhibir l'activitat del FT NF- κ B, destacant el paper antiinflamatori d'aquesta cinasa en l'organisme. Tal com s'ha comentat prèviament, els nostres resultats coincideixen amb el proposat en aquests estudis, ja que confirmen que l'activació de l'AMPK per part de l'oleat evitava la inflamació induïda pel palmitat en cèl·lules de múscul esquelètic.

Recentment diferents investigadors s'han centrat en l'estudi de l'estrès del RE com a desencadenant de la RI (Gregor i Hotamisligil, 2011). Els nostres estudis també van incidir en aquesta relació i, de fet, els experiments amb l'addició de tunicamicina a miotubs murins demostren que l'estrès del RE evita la captació de glucosa en resposta a insulina, fet que ens indicava que les vies moleculars activades en resposta a l'estrès del RE conduïen a RI. Així doncs, el darrer objectiu d'aquest estudi va ser determinar si l'oleat revertia la RI induïda pel palmitat mitjançant mecanismes que involucraven la cinasa AMPK.

En línia amb els resultats obtinguts en els marcadors d'estrès del RE i la inflamació, l'oleat va evitar la reducció causada pel palmitat en els nivells de fosforilació d'AKT induïda per insulina, de la mateixa manera que ho havien fet els activadors farmacològics de l'AMPK. A més, els efectes antidiabètics de l'oleat involucraven la cinasa AMPK, fins al punt que l'addició del compost C va evitar la

recuperació en els nivells de fosforilació d'AKT i l'increment en la captació de glucosa produïda per l'oleat en cèl·lules incubades amb palmitat. De la mateixa manera que en el cas dels efectes de l'oleat sobre l'estrès del RE i el procés inflamatori, la inhibició molecular de l'AMPK va revertir els nivells de fosforilació d'AKT augmentats per l'oleat.

Per tal de confirmar el paper del palmitat i l'oleat sobre l'AMPK en les nostres condicions experimentals, vam determinar els nivells de fosforilació en Thr¹⁷² d'aquesta cinasa, indicatiu de la seva activació. De la mateixa manera que van observar Muse i col. (2004) en ratolins alimentats amb una dieta rica en greixos, en incubar els miotubs murins amb palmitat vam observar una reducció en els nivell de fosforilació de l'AMPK. Ara bé, l'oleat no només no va reduir la fosforilació d'aquesta cinasa, sinó que va ser capaç d'evitar la reducció produïda pel palmitat. Malgrat que la regulació de l'AMPK és molt complexa, en aquest estudi vam voler esbrinar quins eren els mecanismes responsables de la diferent regulació de l'AMPK per part del palmitat i l'oleat. Ha estat descrit que tant la unió de l'AMP com de l'ADP a la subunitat reguladora de l'AMPK poden donar lloc a canvis conformacionals, els quals poden activar l'AMPK facilitant la fosforilació en residus de Thr¹⁷² per part de cinases o evitant la seva desfosforilació per part de fosfatases (Sanders i col., 2007). Així doncs, considerant aquests estudis i altres que confirmen que els AG poden modular al·lostèricament l'AMPK convertint-la en un substrat millor per la cinasa LKB1 (Watt i col., 2006) vam determinar els nivells proteics de la fosfatasa PP2A i de la cinasa LKB1. Encara que els AG estudiats no van afectar als nivells d'aquestes proteïnes, cal destacar el marcat increment en els nivells d'AMP observat en co-incubar cèl·lules amb palmitat i oleat respecte altres incubades només amb BSA, suggerint que la modulació al·lostèrica de l'AMPK per part de l'AMP la convertia en un substrat millor per les cinases responsables de la seva fosforilació. Aquest fet justifica el mecanisme mitjançant el qual l'oleat activa l'AMPK, explicant part dels efectes beneficiosos d'aquest AG front l'estrès del RE, la inflamació i la RI induïda pel palmitat en múscul esquelètic (**Figura 3**).

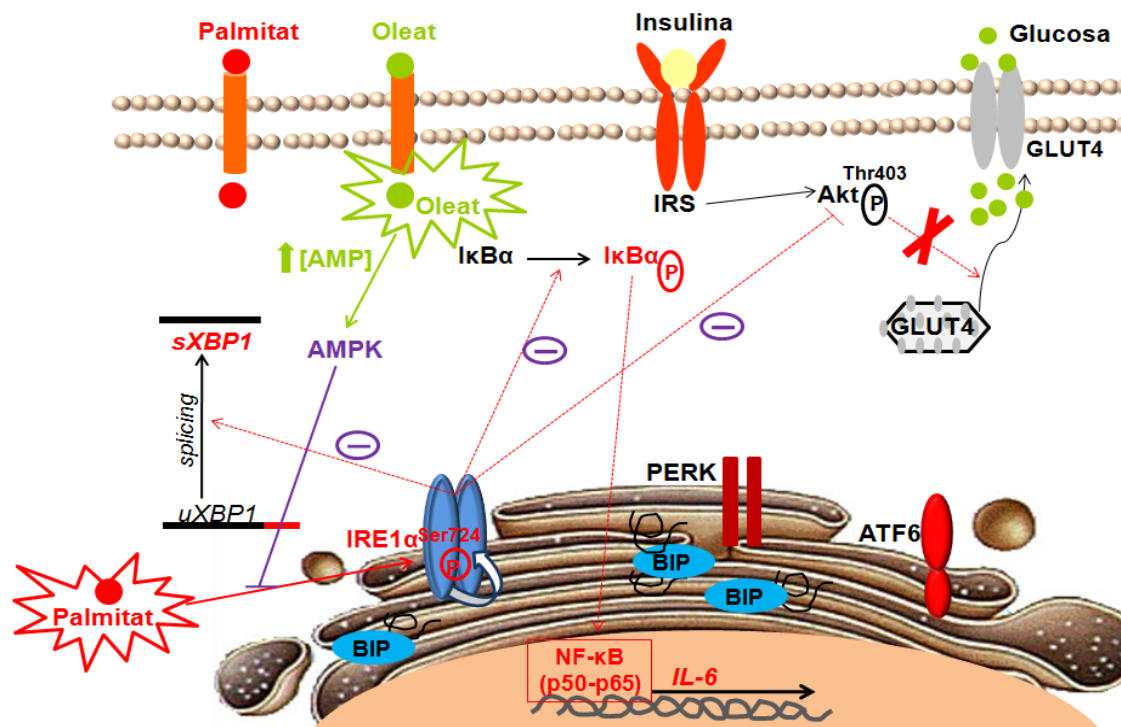


Figura 3. L'activació de l'estrès del RE per part del palmitat podria explicar els efectes d'aquest AG sobre les vies inflammatòries i la RI en múscul esquelètic. Ara bé, l'oleat incrementa els nivells d'AMP intracel·lulars, fet que podria ser responsable de l'activació alostèrica de l'AMPK. Aquesta cinasa juga un paper clau a l'hora d'inhibir l'estrès del RE produït pel palmitat, així com la inflamació i la RI.

II. PPAR β/δ inhibeix la inflamació i la RI en múscul esquelètic reduint l'estrès del RE mitjançant l'activació de l'AMPK.

Atès que en el primer treball presentat en aquesta tesi doctoral vam poder demostrar la importància de l'oleat, i per tant de l'oli d'oliva, per tal de prevenir la inflamació i la RI, a continuació vam voler aprofundir en l'estudi de noves dianes farmacològiques per al tractament d'aquesta patologia. Tenint en compte que els efectes antiinflamatoris i antidiabètics de l'oleat involucren l'estrès del RE, ens vam plantejar que la inhibició farmacològica d'aquesta via podria ser una bona estratègia terapèutica per al tractament de la inflamació i la RI.

D'entrada cal destacar la importància de PPAR β/δ com a diana terapèutica per al tractament de la DM2 (Salvadó i col., 2012), fins al punt que Andrulionyte i col. (2006) van demostrar que alteracions genètiques de PPAR β/δ predeien el desenvolupament de DM2 en pacients que presentaven intolerància a la glucosa. A més, estudis previs realitzats en el nostre laboratori van demostrar que l'activació de PPAR β/δ mitjançant GW501516 evitava la inflamació i la RI induïda per palmitat mitjançant un mecanisme que involucrava l'increment en l'oxidació dels AG en cèl·lules de múscul esquelètic (Coll i col., 2010a). Estudis posteriors van recolzar aquests resultats en confirmar que PPAR β/δ augmentava l'oxidació dels AG i, a més, aquest era responsable d'inhibir l'estrès del RE induït pel palmitat en cèl·lules β pancreàtiques (Cao i col., 2012). Així mateix, ha estat descrit que l'activació de PPAR β/δ també evita l'estrès del RE induït per l'etanol en fetge (Ramirez i col., 2013) i en aorta de ratolins alimentats amb una dieta rica en colesterol (Bojic i col., 2014), malgrat que no es coneixen els mecanismes responsables d'aquests efectes. En els nostres experiments l'activació de PPAR β/δ mitjançant GW501516 va evitar l'estrès del RE induït per lípids en cèl·lules musculars esquelètiques tant *in vivo* com *in vitro*, suggerint que l'increment en l'oxidació dels AG secundària a l'activació de PPAR β/δ podia explicar aquests efectes. Ara bé, en posteriors experiments vam poder demostrar que la inhibició de l'estrès del RE per part de PPAR β/δ va més enllà de l'activació de l'oxidació dels AG, fins al punt que els nostres resultats demostraven que el GW501516 també evitava l'estrès del RE induït per la taspigargina i la tunicamicina tant en miotubs murins com humans.

Nombrosos estudis evidencien que l'estrès del RE precedeix els processos inflamatoris en varis models cel·lulars (Hotamisligil, 2010). Atès que estudis previs realitzats en el nostre laboratori havien demostrat que l'activació farmacològica de PPAR β/δ evitava la inflamació induïda per palmitat en múscul esquelètic (Jové i col.,

2005; Coll i col., 2010a), en aquest estudi ens vam plantejar si el GW501516 podria inhibir la inflamació secundària a l'estrès RE en el nostre model cel·lular. La recuperació en els nivells proteics d'I κ B α produïda pel GW501516 en miotubs murins incubats amb taspigargina va evitar la translocació de p65 al nucli i, per tant, l'activació de vies inflamatòries activades per NF- κ B. Cal destacar que el GW501516 va revertir el procés inflamatori secundari a l'estrès del RE de manera independent del mecanisme implicat en la inducció d'aquest estrès, ja que l'activació farmacològica de PPAR β/δ va evitar l'activitat del FT NF- κ B en cèl·lules de múscul esquelètic humanes incubades tant amb tunicamicina com amb taspigargina. A més, els nostres resultats van demostrar que els efectes antiinflamatoris resultants de l'activació de PPAR β/δ no eren dependents d'espècie, ja que el GW501516 va ser capaç d'evitar l'increment en els nivells d'expressió gènica d'*IL-6* en miotubs murins i humans. Així doncs, fins aleshores podíem afirmar que l'activació de PPAR β/δ evitava la inflamació secundària a l'estrès del RE en múscul esquelètic.

Tanmateix, l'activació farmacològica de PPAR β/δ mitjançant el GW501516 va evitar la reducció en els nivells de fosforilació d'AKT, així com en la captació de glucosa en miotubs murins incubats amb tunicamicina. A més, la intolerància a la glucosa present en ratolins deficients en PPAR β/δ va anar acompanyada d'un increment en la fosforilació d'IRE1 α , fet que confirmava la importància de PPAR β/δ a l'hora d'evitar l'estrès del RE que precedia la inflamació i la RI en el nostre model cel·lular.

Estudis realitzats per Coll i col. (2010a) van demostrar que l'addició de GW501516 a miotubs murins incubats amb palmitat incrementava notablement els nivells de fosforilació de l'AMPK. A més, estudis recents demostren la importància d'aquesta cinasa a l'hora d'evitar l'estrès del RE (Jeong i col., 2013; Yoon i col., 2013), la RI (Hwang i col., 2013) i la inflamació (Green i col., 2011a; Green i col., 2011b) en múscul esquelètic. D'aquesta manera vam voler esbrinar si aquesta proteïna estava implicada en els efectes inhibitoris del GW501516 sobre l'estrès del RE que precedia la inflamació i la RI en el nostre model cel·lular. En línia amb els resultats obtinguts en el primer treball presentat en aquesta tesi doctoral en què vam confirmar que l'AMPK jugava un paper clau a l'hora d'inhibir l'estrès del RE, els resultats d'aquest estudi indicaven que l'activació d'aquesta cinasa explicava els efectes del GW501516 sobre l'estrès del RE responsable de la inflamació i la RI en el nostre model cel·lular. Tanmateix, la inhibició farmacològica de l'AMPK mitjançant el compost C va evitar els efectes inhibitoris del GW501516 sobre l'estrès del RE. De la mateixa manera,

l'addició d'un plasmidi que contenia un mutant de l'AMPK α capaç de desplaçar l'AMPK endògena, va evitar els efectes del GW501516 sobre la inflamació i la RI induïda per l'estrès del RE. L'increment en el ràtio AMP/ATP secundari a l'activació de PPAR β/δ semblava ser el responsable de l'activació al·lostèrica de l'AMPK per part del GW501516. Els efectes de l'activació de PPAR β/δ a l'hora d'incrementar el ràtio AMP/ATP havien estat descrits prèviament en cèl·lules musculars esquelètiques humanes (Krämer i col., 2007) i en fetge (Barroso i col., 2011), fet que recolzava la nostra hipòtesi. A més, Krämer i col. (2007) van proposar que la reducció en els nivells d'ATP per part del GW501516 podria ser el resultat d'una inhibició específica d'un o més complexos de la cadena respiratòria, de l'ATP sintasa o degut al desacoblament mitocondrial.

Així doncs, malgrat que hi ha autors que suggereixen que l'activació de PPAR β/δ inhibeix l'estrès del RE induït per palmitat incrementant l'oxidació dels AG en cèl·lules β pancreàtiques (Cao i col., 2012), el nostre estudi va ser la primera evidència de que l'activació de PPAR β/δ evitava l'estrès del RE induït per activadors farmacològics, tals com la taspigargina i la tunicamicina. A més, en aquest estudi vam poder demostrar que l'AMPK era la responsable d'aquests efectes, fet que corroborava estudis previs que assenyalaven a aquesta cinasa com a proteïna clau a l'hora d'inhibir l'estrès del RE (Terai i col., 2005; Dong i col., 2010a; Dong i col., 2010b; Wang i col., 2011b).

D'altra banda, cal destacar que ha estat descrita la presència d'una regulació negativa entre la proteïna AMPK i l'ERK1/2 (Du i col., 2008; Barroso i col., 2011; Hwang i col., 2013). A més, estudis previs realitzats en el nostre laboratori van demostrar que el GW501516 evitava la fosforilació de la cinasa ERK1/2 en fetge (Serrano-Marco i col., 2012) i adipòcits (Rodríguez-Calvo i col., 2008; Serrano-Marco i col., 2011). Tenint en compte aquests estudis, a continuació vam voler estudiar si l'ERK1/2 estava implicada en els efectes del GW501516 sobre l'estrès del RE. Els nostres resultats van confirmar l'existència d'una regulació negativa entre l'AMPK i l'ERK1/2 en miotubs murins, fins al punt que la reducció en els nivells de fosforilació de l'AMPK induïts per la tunicamicina es van acompanyar d'un increment en la fosforilació d'ERK1/2. A més, en els nostres experiments vam poder confirmar aquesta regulació negativa en models *in vivo*, de manera que ratolins deficients en PPAR β/δ presentaven un increment en els nivells de fosforilació d'ERK1/2 en múscul esquelètic. A més, en línia amb resultats previs obtinguts en el nostre laboratori (Barroso i col., 2011), en tractar ratolins alimentats amb una dieta rica en greixos saturats amb

GW501516 vam observar una reducció en els nivells de fosforilació d'ERK1/2 en múscul esquelètic respecte ratolins alimentats amb la mateixa dieta als quals no se'ls havia administrat el GW501516. A més, aquests resultats es van acompanyar d'una tendència en restablir la fosforilació de l'AMPK. D'aquesta manera podíem afirmar que l'activació de PPAR β/δ modulava la regulació negativa existent entre l'AMPK i l'ERK1/2 secundària a la ingesta d'una dieta rica en greixos saturats en ratolins, donant lloc a un desequilibri d'aquesta regulació a favor de l'AMPK, permetent així la inhibició de l'estrès del RE induït per lípids.

Ha estat descrit que l'increment en la fosforilació de l'AMPK secundària a la inhibició de la via que involucra ERK1/2 en miotubs incubats amb tunicamicina, s'acompanya d'una recuperació en els nivells de fosforilació d'AKT (Hwang i col., 2013). Així doncs, l'ERK1/2 es podria considerar una diana terapèutica per al tractament d'alteracions metabòliques, fins al punt que Jager i col. (2011) van proposar que la inhibició d'ERK1/2 conferia protecció front la RI en ratolins obesos. En línia amb aquests estudis, Barbarroja i col. (2010) van suggerir que l'activació de les vies que involucren ERK1/2 i NF- κ B són importants mediadors de la RI. Tenint en compte que en els nostres experiments tant el GW501516 com l'inhibidor d'ERK1/2 U0126 van recuperar els nivells de fosforilació d'AMPK reduïts per l'estrès del RE en miotubs murins, podem proposar que l'activació de PPAR β/δ per part del GW501516 podria inhibir ERK1/2 i, com a conseqüència, incrementar la fosforilació d'AMPK. Tal com s'ha comentat prèviament, aquesta activació de l'AMPK explicaria els efectes del GW501516 sobre la inflamació i la RI resultants de l'activació de l'estrès del RE en múscul esquelètic (**Figura 4**).

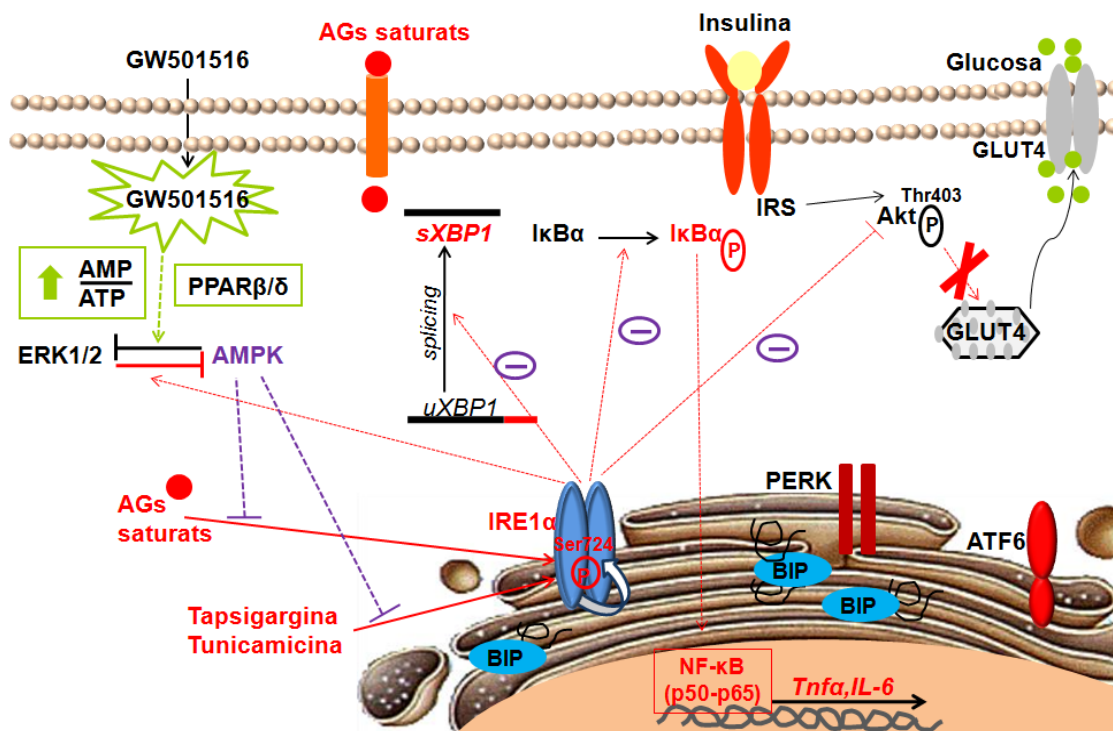


Figura 4. L'estrès del RE condueix a l'activació de vies inflamatòries i RI en múscul esquelètic. L'activació farmacològica de PPAR β/δ mitjançant el GW501516 activa l'AMPK, la qual al seu torn inhibeix la inflamació i la RI induïda per l'estrès del RE. Atès la presència d'una regulació negativa entre les cinases AMPK i ERK1/2, el GW501516 podria actuar inhibint ERK1/2 fet que juntament amb l'increment del ràtio AMP/ATP produït pel mateix, afavoriria l'activació de l'AMPK.

En resum, els resultats obtinguts en aquesta tesi doctoral destaquen el paper de l'AMPK com a proteïna clau a l'hora d'inhibir la inflamació i la RI secundària a l'estrès del RE. D'aquesta manera, podem proposar que el seguiment d'una dieta mediterrània, la qual conté l'oli d'oliva com a greix essencial, juntament amb la pràctica d'exercici físic, podria ser una bona estratègia per a la prevenció de la DM2. De la mateixa manera que l'oleat, l'activació farmacològica de PPAR β/δ inhibeix l'estrès del RE responsable de la inflamació i la RI en múscul esquelètic mitjançant l'activació de l'AMPK. Així doncs, els resultats d'aquesta tesi doctoral aporten nous mecanismes antidiabètics de l'oleat i dels activadors de PPAR β/δ que podrien ser bones estratègies futures per a la prevenció de la RI i de la DM2.

CONCLUSIONS

1. L'oleat evita l'estrès del RE induït pel palmitat en cèl·lules musculars esquelètiques mitjançant mecanismes que no involucren l'activació de PPAR α , PPAR β/δ ni PPAR γ . Tanmateix, els efectes de l'AG monoinsaturat no tenen lloc a través de la mobilització del calci del RE ni mitjançant l'activació de SIRT1.

2. L'activació de la cinasa AMPK per part de l'oleat explica els efectes inhibitoris d'aquest AG sobre l'estrès del RE, la inflamació i la RI en cèl·lules musculars esquelètiques exposades a palmitat.

3. L'activació de PPAR β/δ mitjançant el GW501516 evita l'estrès del RE induït per lípids en múscul esquelètic, així com la inflamació i la RI secundària a l'estrès del RE en cèl·lules musculars esquelètiques.

4. La regulació negativa entre les cinases AMPK i ERK1/2 en cèl·lules musculars esquelètiques suggereix que la inhibició de l'ERK1/2 secundària a l'activació de PPAR β/δ podria modular aquesta regulació negativa a favor de l'AMPK. Així, l'activació de l'AMPK per part del GW501516 explica els efectes inhibitoris de PPAR β/δ sobre la inflamació i la RI induïda per l'estrès del RE.

BIBLIOGRAFIA

Abu-Elheiga, L., Almarza-Ortega, D. B., Baldini, A., Wakil, S. J. Human Acetyl-CoA Carboxylase 2. Molecular cloning, characterization, chromosomal mapping, and evidence for two isoforms. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272(16):10669–10677

Abu-Elheiga, L., Brinkley, W. R., Zhong, L., Chirala, S. S., Woldegiorgis, G., Wakil, S. J. The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(4):1444–9

Aguirre V., Uchida T., Yenush L., Davis R., Whitei M.F. Aguirre, V. The c-Jun NH2-terminal Kinase Promotes Insulin Resistance during Association with Insulin Receptor Substrate-1 and Phosphorylation of Ser307. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(12): 9047–9054

Ahima, R. S., & Lazar, M. A. Physiology. The health risk of obesity--better metrics imperative. *Science (New York, N.Y.)*. 2013;341(6148):856–8

Aitman, T. J., Glazier, A. M., Wallace, C. A., Cooper, L. D., Norsworthy, P. J., Wahid, F. N., ... Scott, J. Identification of Cd36 (Fat) as an insulin-resistance gene causing defective fatty acid and glucose metabolism in hypertensive rats. *Nature Genetics*. 1999;21(1):76–83

Allen, T. L., & Febbraio, M. A. IL6 as a mediator of insulin resistance: fat or fiction? *Diabetologia*. 2010;53(3):399–402

Andrulionyte, L., Peltola, P., Chiasson, J.-L., Laakso, M. Single nucleotide polymorphisms of PPARG in combination with the Gly482Ser substitution of PGC-1A and the Pro12Ala substitution of PPARG2 predict the conversion from impaired glucose tolerance to type 2 diabetes: the STOP-NIDDM trial. *Diabetes*. 2006;55(7):2148–52

Araki E., Lipes M.A., Patti M.E., Brüning J.C., Haag B., Johnson R.S., Kahn CR. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature*. 1994;372(6502):186-90

Arenzana-Seisdedos, F., Thompson, J., Rodriguez, M. S., Bachelierie, F., Thomas, D., Hay, R. T. Inducible nuclear expression of newly synthesized I kappa B alpha negatively regulates DNA-binding and transcriptional activities of NF-kappa B. *Molecular and Cellular Biology*. 1995;15(5):2689–96

Ariyama, H., Kono, N., Matsuda, S., Inoue, T., Arai, H. Decrease in membrane phospholipid unsaturation induces unfolded protein response. *The Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(29):22027–35

American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2014;37(1):S81–90

Augustin, R. The protein family of glucose transport facilitators: It's not only about glucose after all. *IUBMB Life*. 2010;62(5):315–33

Bailly-Maitre, B., Belgardt, B. F., Jordan, S. D., Coornaert, B., von Freyend, M. J., Kleinridders, A., ... Brüning, J. C. Hepatic Bax inhibitor-1 inhibits IRE1 alpha and protects from obesity-associated insulin resistance and glucose intolerance. *The*

Journal of Biological Chemistry. 2010;285(9):6198–207

Barbarroja, N., López-Pedreira, R., Mayas, M. D., García-Fuentes, E., Garrido-Sánchez, L., Macías-González, M., ... Tinahones, F. J. The obese healthy paradox: is inflammation the answer? *The Biochemical Journal*. 2010;430(1):141–9

Barroso, E., Rodríguez-Calvo, R., Serrano-Marco, L., Astudillo, A. M., Balsinde, J., Palomer, X., Vázquez-Carrera, M. The PPAR β/δ activator GW501516 prevents the down-regulation of AMPK caused by a high-fat diet in liver and amplifies the PGC-1 α -Lipin 1-PPAR α pathway leading to increased fatty acid oxidation. *Endocrinology*. 2011;152(5):1848–59

Beg, A. A., Sha, W. C., Bronson, R. T., Baltimore, D. Constitutive NF-kappa B activation, enhanced granulopoiesis, and neonatal lethality in I kappa B alpha-deficient mice. *Genes & Development*. 1995; 9(22):2736–2746

Bendayan, M., Londono, I., Kemp, B. E., Hardie, G. D., Ruderman, N., Prentki, M. Association of AMP-activated protein kinase subunits with glycogen particles as revealed in situ by immunoelectron microscopy. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*. 2009;57(10):963–71

Berg, A. H., & Scherer, P. E. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circulation Research*. 2005;96(9):939–49

Bergouignan, A., Momken, I., Schoeller, D. a, Simon, C., Blanc, S. Metabolic fate of saturated and monounsaturated dietary fats: the Mediterranean diet revisited from epidemiological evidence to cellular mechanisms. *Progress in Lipid Research*. 2009;48(3-4):128–47

Berridge, M. J., Bootman, M. D., Roderick, H. L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 2003;4(7):517–29

Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L. M., Harding, H. P., Ron, D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nature Cell Biology*. 2000;2(6): 326–32

Björnholm, M., He, A. R., Attersand, A., Lake, S., Liu, S. C. H., Lienhard, G. E., ... Zierath, J. R. Absence of functional insulin receptor substrate-3 (IRS-3) gene in humans. *Diabetologia*. 2002;45(12):1697–702

Boden, G., & Chen, X. Effects of fat on glucose uptake and utilization in patients with non-insulin-dependent diabetes. *The Journal of Clinical Investigation*. 1995;96(3):1261–8

Boden, G., Jadali, F., White, J. Effects of fat on insulin-stimulated carbohydrate metabolism in normal men. *Journal of Clinical Investigation*. 1991;88(3):960–966

Boden, G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes*. 1997;46(1):3-10

Bojic, L. A., Burke, A. C., Chhoker, S. S., Telford, D. E., Sutherland, B. G., Edwards, J. Y., ... Huff, M. W. Peroxisome proliferator-activated receptor δ agonist GW1516

attenuates diet-induced aortic inflammation, insulin resistance, and atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor knockout mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2014;34(1):52–60

Boni, L. T., & Rando, R. R. The nature of protein kinase C activation by physically defined phospholipid vesicles and diacylglycerols. *The Journal of Biological Chemistry*. 1985;260(19):10819–25

Brazil, D. P., Yang, Z.-Z., Hemmings, B. A. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends in Biochemical Sciences*. 2004;29(5):233–42

Brownsey, R. W., Boone, a N., Elliott, J. E., Kulpa, J. E., Lee, W. M. Regulation of acetyl-CoA carboxylase. *Biochemical Society Transactions*. 2006;34(Pt 2):223–7

Brunmair, B., Staniek, K., Gras, F., Scharf, N., Althaym, A., Clara, R., Roden, M., Gnaiger, E., Nohl, H., Waldhäusl, W., Fürnsinn, C. Thiazolidinediones, like metformin, inhibit respiratory complex I: a common mechanism contributing to their antidiabetic actions? *Diabetes*. 2004;53(4):1052-9

Bursten, S. L., Harris, W. E., Bomszyk, K., Lovett, D. Interleukin-1 rapidly stimulates lysophosphatidate acyltransferase and phosphatidate phosphohydrolase activities in human mesangial cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 1991;266(31):20732–43

Cacicedo, J. M., Yagihashi, N., Keaney, J. F., Ruderman, N. B., Ido, Y. AMPK inhibits fatty acid-induced increases in NF-kappaB transactivation in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004;324(4):1204–9

Cai, D., Yuan, M., Frantz, D., Melendez, P. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- β and NF- κ B. *Nature Medicine*. 2005;11(2):183–190

Calder, P. C., Ahluwalia, N., Brouns, F., Buetler, T., Clement, K., Cunningham, K., ... Winklhofer-Roob, B. M. Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. *The British Journal of Nutrition*. 2011;106 Suppl3:S5–78

Calera, M. R. Insulin Increases the Association of Akt-2 with Glut4-containing Vesicles. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(13):7201–7204

Cantó, C., Gerhart-Hines, Z., Feige, J. N., Lagouge, M., Noriega, L., Milne, J. C., ... Auwerx, J. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature*. 2009;458(7241):1056–60

Cao, M., Tong, Y., Lv, Q., Chen, X., Long, Y., Jiang, L., ... Tong, N. PPAR δ Activation Rescues Pancreatic β -Cell Line INS-1E from Palmitate-Induced Endoplasmic Reticulum Stress through Enhanced Fatty Acid Oxidation. *PPAR Research*. 2012;2012:680684

Carey, A. L., & Febbraio, M. A. Interleukin-6 and insulin sensitivity: friend or foe? *Diabetologia*. 2004;47(7):1135–42

Carey, A. L., Steinberg, G. R., Macaulay, S. L., Thomas, W. G., Holmes, A. G., Ramm, G., ... Febbraio, M. A. Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in

humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase. *Diabetes*. 2006;55(10):2688–97

Chalmers, C. J., Gilley, R., March, H. N., Balmanno, K., Cook, S. J. The duration of ERK1/2 activity determines the activation of c-Fos and Fra-1 and the composition and quantitative transcriptional output of AP-1. *Cellular Signalling*. 2007;19(4): 695–704

Chan, T.O., Rittenhouse, S.E., Tschlis, P.N. AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Annu Rev Biochem*. 1999;68:965-1014

Chang, C. H., Chey, W. Y., Chang, T. M. Cellular mechanism of sodium oleate-stimulated secretion of cholecystokinin and secretin. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2000;279(2): G295–303

Chang, L., & Karin, M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*. 2001; 410(6824):37–40

Chavez, J. A., Knotts, T. A., Wang, L.-P., Li, G., Dobrowsky, R. T., Florant, G. L., Summers, S. A. A role for ceramide, but not diacylglycerol, in the antagonism of insulin signal transduction by saturated fatty acids. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(12):10297–303

Cheang, W. S., Tian, X. Y., Wong, W. T., Lau, C. W., Lee, S. S.-T., Chen, Z. Y., ... Huang, Y. Metformin Protects Endothelial Function in Diet-Induced Obese Mice by Inhibition of Endoplasmic Reticulum Stress Through 5' Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase-Peroxisome Proliferator-Activated Receptor δ Pathway. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2014 Apr;34(4):830-6

Chen, H., & Qi, L. SUMO modification regulates the transcriptional activity of XBP1. *Biochem. J*. 2010;429(1):95–102

Chen, L., Mu, Y., Greene, W. C. Acetylation of RelA at discrete sites regulates distinct nuclear functions of NF-kappaB. *The EMBO Journal*, 2002;21(23):6539–48

Chen, W. S., Xu, P. Z., Gottlob, K., Chen, M. L., Sokol, K., Shiyanova, T., ... Hay, N. Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene. *Genes & Development*. 2001;15(17):2203–8

Chen, Z.P., McConell, G.K., Mitchell, B.J., Snow, R.J., Canny, B.J., Kemp, B.E. AMPK signaling in contracting human skeletal muscle: acetyl-CoA carboxylase and NO synthase phosphorylation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000;279(5):E1202-6

Cho, H., Mu, J., Kim, J. K., Thorvaldsen, J. L., Chu, Q., Crenshaw, E. B., ... Birnbaum, M. J. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science (New York, N.Y.)*. 2001;292(5522):1728–31

Chung, S., Yao, H., Caito, S., Hwang, J.W., Arunachalam, G., Rahman, I. Regulation of SIRT1 in cellular functions: role of polyphenols. *Arch Biochem Biophys*. 2010;501(1):79-90

Clark, H., Carling, D., Saggerson, D. Covalent activation of heart AMP-activated protein kinase in response to physiological concentrations of long-chain fatty acids. *European Journal of Biochemistry / FEBS*. 2004;271(11):2215–24

Clarke, D. C., Miskovic, D., Han, X.-X., Calles-Escandon, J., Glatz, J. F. C., Luiken, J. J. F. P., ... Bonen, A. Overexpression of membrane-associated fatty acid binding protein (FABPpm) in vivo increases fatty acid sarcolemmal transport and metabolism. *Physiological Genomics*. 2004;17(1):31–7

Coen, P. M., & Goodpaster, B. H. Role of intramyocellular lipids in human health. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*. 2012;23(8):391–8

Coleman, R. A. & Lee, D.P. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Progress in Lipid Research*. 2004;43(2):134–176

Coleman, R.A., Lewin, T.M., Van Horn, C.G., Gonzalez-Baró, M.R. Do long-chain acyl-CoA synthetases regulate fatty acid entry into synthetic versus degradative pathways? *J Nutr*. 2002;132(8):2123-6

Coll, T., Alvarez-Guardia, D., Barroso, E., Gómez-Foix, A. M., Palomer, X., Laguna, J. C., Vázquez-Carrera, M. 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*. 2010a;151(4):1560–9

Coll, T., Eyre, E., Rodríguez-Calvo, R., Palomer, X., Sánchez, R. M., Merlos, M., ... Vázquez-Carrera, M. Oleate reverses palmitate-induced insulin resistance and inflammation in skeletal muscle cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(17):11107–16

Coll, T., Jové, M., Rodríguez-Calvo, R., Eyre, E., Palomer, X., Sánchez, R. M., ... Vázquez-Carrera, M. 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(10):2779–87

Coll, T., Palomer, X., Blanco-Vaca, F., Escolà-Gil, J. C., Sánchez, R. M., Laguna, J. C., Vázquez-Carrera, M. Cyclooxygenase 2 inhibition exacerbates palmitate-induced inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells. *Endocrinology*. 2010b;151(2):537–48

Corton, J.M., Gillespie, J.G., Hawley, S.A., Hardie, D.G. 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *Eur J Biochem*. 1995;229(2):558-65

Coudronniere, N., Villalba, M., Englund, N., Altman, A. NF-kappa B activation induced by T cell receptor/CD28 costimulation is mediated by protein kinase C-theta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(7):3394–9

Cox, J.S., Shamu, C.E., Walter, P. Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell*. 1993;73(6):1197-206

Cullinan, S. B., & Diehl, J. A. PERK-dependent activation of Nrf2 contributes to redox homeostasis and cell survival following endoplasmic reticulum stress. *The Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(19):20108–17

Cullinan, S.B., Zhang, D., Hannink, M., Arvisais, E., Kaufman, R.J., Diehl, J.A. Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Mol Cell Biol*. 2003;23(20):7198-209

Darling, N. J., & Cook, S. J. The role of MAPK signalling pathways in the response to endoplasmic reticulum stress. *Biochim Biophys Acta*. 2014;S0167-4889(14):00013-5

Dasu, M., & Jialal, I. Free fatty acids in the presence of high glucose amplify monocyte inflammation via Toll-like receptors. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2011;300(1):E145-54

Davies, S. P., Helps, N. R., Cohen, P. T., Hardie, D. G. 5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C alpha and native bovine protein phosphatase-2AC. *FEBS Letters*. 1995;377(3):421–5

Davies, S.P., Sim, A.T., Hardie, D.G. Location and function of three sites phosphorylated on rat acetyl-CoA carboxylase by the AMP-activated protein kinase. *Eur J Biochem*. 1990;187(1):183-90

Davis, R. J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*. 2000;103(2):239–52

Daynes, R. A., & Jones, D. C. Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. *Nature Reviews. Immunology*. 2002;2(10):748–59

De Mello, V. D. F., Lankinen, M., Schwab, U., Kolehmainen, M., Lehto, S., Seppänen-Laakso, T., ... Erkkilä, a T. Link between plasma ceramides, inflammation and insulin resistance: association with serum IL-6 concentration in patients with coronary heart disease. *Diabetologia*. 2009;52(12):2612–5

De Souza, C. T., Araujo, E. P., Bordin, S., Ashimine, R., Zollner, R. L., Boschero, A. C., ... Velloso, L. A. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology*. 2005;146(10):4192–9

Dearth, R.K., Cui, X., Kim, H.J., Hadsell, D.L., Lee, A.V. Oncogenic transformation by the signaling adaptor proteins insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2. *Cell Cycle*. 2007;6(6):705-13

DeFronzo, R. A. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *The Medical Clinics of North America*. 2004;88(4):787–835

Deldicque, L., Cani, P.D., Philp, A., Raymackers, J.M., Meakin, P.J., Ashford, M.L., ... Baar, K. The unfolded protein response is activated in skeletal muscle by high-fat feeding: potential role in the downregulation of protein synthesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010;299(5):E695-705

Delépine, M., Nicolino, M., Barrett, T., Golamaully, M., Lathrop, G. M., Julier, C. EIF2AK3, encoding translation initiation factor 2-alpha kinase 3, is mutated in patients with Wolcott-Rallison syndrome. *Nature Genetics*. 2000;25(4):406–9

Delerive, P., De Bosscher, K., Vanden Berghe, W., Fruchart, J.C., Haegeman, G., Staels, B. DNA binding-independent induction of IkappaBalpha gene transcription by PPARalpha. *Mol Endocrinol*. 2002;16(5):1029-39

Deng, J., Lu, P.D., Zhang, Y., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Sonenberg, N., ... Ron D. Translational repression mediates activation of nuclear factor kappa B by phosphorylated translation initiation factor 2. *Mol Cell Biol*. 2004;24(23):10161-8

Deniaud, a, Sharaf el dein, O., Maillier, E., Poncet, D., Kroemer, G., Lemaire, C., Brenner, C. Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. *Oncogene*. 2008;27(3):285–99

Desvergne, B., & Wahli, W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocrine Reviews*. 1999;20(5):649–88

Dimitriadis, G., Mitrou, P., Lambadiari, V., Maratou, E., Raptis, S. A. Insulin effects in muscle and adipose tissue. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2011;93 Suppl 1:S52–9

Doege, H., & Stahl, A. Protein-mediated fatty acid uptake: novel insights from in vivo models. *Physiology (Bethesda, Md.)*. 2006;21:259–68

Doménech M, Roman P, Lapetra J, García de la Corte FJ, Sala-Vila A, de la Torre R, ... Ros E. Mediterranean diet reduces 24-hour ambulatory blood pressure, blood glucose, and lipids: one-year randomized, clinical trial. *Hypertension*. 2014;64(1):69-76

Dong, Y., Zhang, M., Liang, B., Xie, Z., Zhao, Z. Reduction of AMP-activated protein kinase $\alpha 2$ increases endoplasmic reticulum stress and atherosclerosis in vivo. *Circulation*. 2010a;121(6):792–803

Dong, Y., Zhang, M., Wang, S., Liang, B., Zhao, Z., Liu, C., ... Zou MH. Activation of AMP-activated protein kinase inhibits oxidized LDL-triggered endoplasmic reticulum stress in vivo. *Diabetes*. 2010b;59(6):1386-96

Du, J., Guan, T., Zhang, H., Xia, Y., Liu, F., Zhang, Y. Inhibitory crosstalk between ERK and AMPK in the growth and proliferation of cardiac fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2008;368(2):402–7

Du, K., Herzig, S., Kulkarni, R. N., Montminy, M. TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver. *Science (New York, N.Y.)*. 2003;300(5625):1574–

7

Eferl, R., & Wagner, E. F. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nature Reviews. Cancer*. 2003;3(11):859–68

Ehnes, J.A., Perren, A., Eppler, E., Ribaux, P., Pospisilik, J.A., Maor-Cahn, R., ... Donath MY. Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2007;56(9):2356-70

Engel, A., & Barton, G. M. Unfolding new roles for XBP1 in immunity. *Nature Immunology*. 2010;11(5):365–7

Erbay, E., Babaev, V., Mayers, J. Reducing endoplasmic reticulum stress through a macrophage lipid chaperone alleviates atherosclerosis. *Nature Medicine*. 2009;15(12):1383–1391

Faergeman, N. J., & Knudsen, J. Role of long-chain fatty acyl-CoA esters in the regulation of metabolism and in cell signalling. *The Biochemical Journal*. 1997;323(1):1–12

Fantin, V. R., Wang, Q., Lienhard, G. E., Keller, S. R. Mice lacking insulin receptor substrate 4 exhibit mild defects in growth, reproduction, and glucose homeostasis. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*. 2000;278(1):E127–33

Febbraio, M., Hajjar, D.P., Silverstein, R.L. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest*. 2001;108(6):785-91

Feng, B., Yao, P. M., Li, Y., Devlin, C. M., Zhang, D., Harding, H. P., ... Tabas, I. The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages. *Nature Cell Biology*. 2003;5(9):781–92

Fielding, B. A., Callow, J., Owen, R. M., Samra, J. S., Matthews, D. R., Frayn, K. N. Postprandial lipemia: the origin of an early peak studied by specific dietary fatty acid intake during sequential meals. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1996;63(1):36–41

Finck, B. N., Bernal-Mizrachi, C., Han, D. H., Coleman, T., Sambandam, N., LaRiviere, L. L., ... Kelly, D. P. A potential link between muscle peroxisome proliferator- activated receptor- α signaling and obesity-related diabetes. *Cell Metabolism*. 2005;1(2):133–44

Flamment, M., Hajduch, E., Ferré, P., Foufelle, F. New insights into ER stress-induced insulin resistance. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*. 2012;23(8):381–90

Frame, S., & Cohen, P. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *The Biochemical Journal*. 2001;359(1):1–16

Franckhauser, S., Elias, I., Rotter Sopasakis, V., Ferré, T., Nagaev, I., Andersson, C. X., ... Smith, U. Overexpression of Il6 leads to hyperinsulinaemia, liver inflammation and reduced body weight in mice. *Diabetologia*. 2008;51(7):1306–16

Freidenberg, G. R., Reichart, D., Olefsky, J. M., Henry, R. R. Reversibility of defective adipocyte insulin receptor kinase activity in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Effect of weight loss. *The Journal of Clinical Investigation*. 1988;82(4):1398–406

Fujishiro, M., Gotoh, Y., Katagiri, H., Sakoda, H., Ogihara, T., Anai, M., ... Asano, T. Three mitogen-activated protein kinases inhibit insulin signaling by different

mechanisms in 3T3-L1 adipocytes. *Molecular Endocrinology* (Baltimore, Md.). 2003;17(3):487–97

Garg, A. D., Kaczmarek, A., Krysko, O., Vandenabeele, P., Krysko, D. V, Agostinis, P. ER stress-induced inflammation: does it aid or impede disease progression? *Trends in Molecular Medicine*.2012;18(10):589–98

Gauthier MS, O'Brien EL, Bigornia S, Mott M, Cacicedo JM, Xu XJ, ... Ruderman N. Decreased AMP-activated protein kinase activity is associated with increased inflammation in visceral adipose tissue and with whole-body insulin resistance in morbidly obese humans. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;404(1):382-7

Gerhart-Hines, Z., & Jr, J. D. The cAMP/PKA Pathway Rapidly Activates SIRT1 to Promote Fatty Acid Oxidation Independently of Changes in NAD⁺. *Molecular Cell*. 2011;44(6):851–863

Gerhart-Hines, Z., Rodgers, J. T., Bare, O., Lerin, C., Kim, S.-H., Mostoslavsky, R., ... Puigserver, P. Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1 α . *The EMBO Journal*. 2007;26(7):1913–23

Gill, J. M. R., & Sattar, N. Ceramides: a new player in the inflammation-insulin resistance paradigm? *Diabetologia*. 2009;52(12):2475–7

Gillingham, L. G., Harris-Janz, S., Jones, P. J. H. Dietary monounsaturated fatty acids are protective against metabolic syndrome and cardiovascular disease risk factors. *Lipids*. 2011;46(3):209–28

Gimeno, R., & Cao, J. Thematic review series: glycerolipids. Mammalian glycerol-3-phosphate acyltransferases: new genes for an old activity. *J Lipid Res*. 2008;49(10):2079-88

Gimeno, R. E., Ortegon, A. M., Patel, S., Punreddy, S., Ge, P., Sun, Y., ... Stahl, A. Characterization of a heart-specific fatty acid transport protein. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(18):16039–44

Glass, C. K. & Olefsky, J. M. Inflammation and lipid signaling in the etiology of insulin resistance. *Cell Metabolism*. 2012;15(5):635–45

Glatz, J., Luiken, J., Bonen, A. Membrane fatty acid transporters as regulators of lipid metabolism: implications for metabolic disease. *Physiological Reviews*. 2010;90(1):367-417

Glatz, J.F., Storch, J. Unravelling the significance of cellular fatty acid-binding proteins. *Curr Opin Lipidol*. 2001;12(3):267-74

Görlach, A., Klappa, P., Kietzmann, T. The endoplasmic reticulum: folding, calcium homeostasis, signaling, and redox control. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2006;8(9-10): 1391–418

Grandvaux, N., Soucy-Faulkner, A., Fink, K. Innate host defense: Nox and Duox on phox's tail. *Biochimie*. 2007;89(9):1113–22

Green, C. J., Macrae, K., Fogarty, S., Hardie, D. G., Sakamoto, K., Hundal, H. S. Counter-modulation of fatty acid-induced pro-inflammatory nuclear factor κ B signalling in rat skeletal muscle cells by AMP-activated protein kinase. *The Biochemical Journal*. 2011a;435(2):463–74

Green, C. J., Pedersen, M., Pedersen, B. K., Scheele, C. Elevated NF- κ B activation is conserved in human myocytes cultured from obese type 2 diabetic patients and attenuated by AMP-activated protein kinase. *Diabetes*. 2011b;60(11):2810–9

Greer, E. L., Oskoui, P. R., Banko, M. R., Maniar, J. M., Gygi, M. P., Gygi, S. P., Brunet, A. The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor. *The Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(41):30107–19

Gregor, M. F., & Hotamisligil, G. S. Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. *Journal of Lipid Research*. 2007;48(9):1905–14

Gregor, M. F., & Hotamisligil, G. S. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annual Review of Immunology*. 2011;29:415–45

Grundy, S. M. Metabolic syndrome pandemic. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2008;28(4):629–36

Gu, X., Li, K., Laybutt, D. R., He, M., Zhao, H.-L., Chan, J. C. N., Xu, G. Bip overexpression, but not CHOP inhibition, attenuates fatty-acid-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in HepG2 liver cells. *Life Sciences*. 2010;87(23-26):724–32

Gwiazda, K.S., Yang, T.L., Lin, Y., Johnson, J.D. Effects of palmitate on ER and cytosolic Ca²⁺ homeostasis in beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;296(4):E690-701

Ha, J., Daniel, S., Broyles, S., Kim, K. Critical phosphorylation sites for acetyl-CoA carboxylase activity. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269(35):22162–22168

Häcker, H., & Karin, M. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Science's STKE : Signal Transduction Knowledge Environment*. 2006;2006(357):re13

Hage Hassan, R., Hainault, I., Vilquin, J.-T., Samama, C., Lasnier, F., Ferré, P., ... Hajdouch, E. Endoplasmic reticulum stress does not mediate palmitate-induced insulin resistance in mouse and human muscle cells. *Diabetologia*. 2012;55(1):204–14

Han, D., Lerner, A., Walle, L. Vande, Upton, J. IRE1 α kinase activation modes control alternate endoribonuclease outputs to determine divergent cell fates. *Cell*. 2009;138(3):562–575

Hardie, D. G., & Pan, D. A. Regulation of fatty acid synthesis and oxidation by the AMP-activated protein kinase. *Biochemical Society Transactions*. 2002;30(6):1064–70

Harding, H. P., Zeng, H., Zhang, Y., Jungries, R., Chung, P., Plesken, H., ... Ron, D. Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in *perk*^{-/-} mice reveals a role for translational control in secretory cell survival. *Molecular Cell*. 2001;7(6):1153–63

Harding, H. P., Zhang, Y., Bertolotti, A., Zeng, H., Ron, D. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Molecular Cell*. 2000;5(5):897–904

Harding HP, Zhang Y, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*. 1999;397(6716):271-4

Harding, H., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Molecular Cell*. 2003;11:619–633

Harris, T. E., & Lawrence, J. C. TOR signaling. *Science's STKE : Signal Transduction Knowledge Environment*. 2003;2003(212):re15

Hausman, D.B., DiGirolamo, M., Bartness, T.J., Hausman, G.J., Martin, R.J. The biology of white adipocyte proliferation. *Obes Rev*. 2001;2(4):239-54

Hawley, S.A., Davison, M., Woods, A., Davies, S.P., Beri, R.K., Carling, D., Hardie, D.G. Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*. 1996;271(44):27879-87

Hayden, M. S., & Ghosh, S. Signaling to NF-kappaB. *Genes & Development*. 2004;18(18):2195–224

Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., Mori, K. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Molecular Biology of the Cell*. 1999;10(11):3787–99

Helge, J. W., Stallknecht, B., Drachmann, T., Hellgren, L. I., Jiménez-Jiménez, R., Andersen, J. L., ... Bruun, J. M. Improved glucose tolerance after intensive life style intervention occurs without changes in muscle ceramide or triacylglycerol in morbidly obese subjects. *Acta Physiologica (Oxford, England)*. 2011;201(3):357–64

Helge, J.W., Tobin, L., Drachmann, T., Hellgren, L.I., Dela, F., Galbo, H. Muscle ceramide content is similar after 3 weeks' consumption of fat or carbohydrate diet in a crossover design in patients with type 2 diabetes. *Eur J Appl Physiol*. 2012;112(3):911-8

Herman, William H., and Michael M. Engelgau. "Screening for Type 2 Diabetes Mellitus in Asymptomatic Adults." *Clinical Diabetes* 2000;18(2):68-68

Hetz, C., Bernasconi, P., Fisher, J., Lee, A.-H., Bassik, M. C., Antonsson, B., ... Korsmeyer, S. J. Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1alpha. *Science (New York, N.Y.)*. 2006;312(5773):572–6

Hetz, C., & Glimcher, L. Fine-tuning of the unfolded protein response: assembling the IRE1 α interactome. *Molecular Cell*. 2009;35(5):551–561

- Hickson-Bick, D. L., Buja, L. M., McMillin, J. B. Palmitate-mediated alterations in the fatty acid metabolism of rat neonatal cardiac myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2000;32(3):511–9
- Hirosumi, J., Tuncman, G., Chang, L., Görgün, C. Z., Uysal, K. T., Maeda, K., ... Hotamisligil, G. S. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*. 2002;420(6913):333–6
- Hirsch, D., Stahl, A., Lodish, H. F. A family of fatty acid transporters conserved from mycobacterium to man. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(15):8625–9
- Hoareau, L., Bencharif, K., Rondeau, P., Murumalla, R., Ravanan, P., Tallet, F., ... Festy, F. Signaling pathways involved in LPS induced TNFalpha production in human adipocytes. *Journal of Inflammation (London, England)*. 2010;7:1
- Holland, W.L., Bikman, B.T., Wang, L.P., Yuguang, G., Sargent, K.M., Bulchand, S., ... Summers SA. Lipid-induced insulin resistance mediated by the proinflammatory receptor TLR4 requires saturated fatty acid-induced ceramide biosynthesis in mice. *J Clin Invest*. 2011;121(5):1858-70
- Hollien, J., Lin, J. H., Li, H., Stevens, N., Walter, P., Weissman, J. S. Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. *The Journal of Cell Biology*. 2009;186(3):323–31
- Hollien, J., & Weissman, J. S. Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. *Science (New York, N.Y.)*. 2006;313(5783):104–7
- Hosogai, N., Fukuhara, A., Oshima, K., Miyata, Y., Tanaka, S., Segawa, K., ... Shimomura, I. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes*. 2007;56(4):901–11
- Hotamisligil, G. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell*. 2010;140(6):900–917
- Hotamisligil, G.S., Arner, P., Caro, J.F., Atkinson, R.L., Spiegelman, B.M. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*. 1995;95(5):2409-15
- Hotamisligil, G., & Erbay, E. Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. *Nature Reviews Immunology*. 2008;8(12):1–26
- Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S., Spiegelman, B.M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993;259(5091):87-91
- Hou, X., Xu, S., Maitland-Toolan, K. A., Sato, K., Jiang, B., Ido, Y., ... Zang, M. SIRT1 regulates hepatocyte lipid metabolism through activating AMP-activated protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(29):20015–26
- Hu, F. B., van Dam, R. M., Liu, S. Diet and risk of Type II diabetes: the role of types of fat and carbohydrate. *Diabetologia*. 2001;44(7):805–17

Hu, P., Han, Z., Couvillon, A.D., Kaufman, R.J., Exton, J.H. Autocrine tumor necrosis factor alpha links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway through IRE1alpha-mediated NF-kappaB activation and down-regulation of TRAF2 expression. *Mol Cell Biol.* 2006;26(8):3071-84

Hu, W., Ross, J., Geng, T., Brice, S. E., Cowart, L. A. Differential regulation of dihydroceramide desaturase by palmitate versus monounsaturated fatty acids: implications for insulin resistance. *The Journal of Biological Chemistry.* 2011;286(19):16596–605

Huang, S., Rutkowsky, J.M., Snodgrass, R.G., Ono-Moore, K.D., Schneider, D.A., Newman, J.W., ... Hwang, D.H. Saturated fatty acids activate TLR-mediated proinflammatory signaling pathways. *J Lipid Res.* 2012;53(9):2002-13

Hubbard, S., & Till, J. Protein tyrosine kinase structure and function. *Annual Review of Biochemistry.* 2000;69:373-98

Hundal, R.S., Petersen, K.F., Mayerson, A.B., Randhawa, P.S., Inzucchi, S., Shoelson, S.E., Shulman, G.I. Mechanism by which high-dose aspirin improves glucose metabolism in type 2 diabetes. *J Clin Invest.*2002;109(10):1321-6

Hwang, S.-L., Jeong, Y.-T., Li, X., Kim, Y. D., Lu, Y., Chang, Y.-C., ... Chang, H. W. Inhibitory cross-talk between the AMPK and ERK pathways mediates endoplasmic reticulum stress-induced insulin resistance in skeletal muscle. *British Journal of Pharmacology.* 2013;169(1):69–81

Jpenberg, A. Polarity and Specific Sequence Requirements of Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR)/Retinoid X Receptor Heterodimer Binding to DNA. A functional analysis of the malic enzyme gene PPAR response element. *Journal of Biological Chemistry.* 1997;272(32):20108–20117

International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas*, 6th edn. Brussels, Belgium: 2013

Isola, L. M., Zhou, S. L., Kiang, C. L., Stump, D. D., Bradbury, M. W., Berk, P. D. 3T3 fibroblasts transfected with a cDNA for mitochondrial aspartate aminotransferase express plasma membrane fatty acid-binding protein and saturable fatty acid uptake. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1995;92(21):9866–70

Issemann, I., Prince, R. a, Tugwood, J. D., Green, S. The peroxisome proliferator-activated receptor:retinoid X receptor heterodimer is activated by fatty acids and fibrate hypolipidaemic drugs. *Journal of Molecular Endocrinology.* 1993;11(1):37–47

Itani, S.I., Ruderman, N.B., Schmieder, F., Boden, G. Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and IkkappaB-alpha. *Diabetes.* 2002;51(7):2005-11

Jaeschke, A., Czech, M., Davis, R. An essential role of the JIP1 scaffold protein for JNK activation in adipose tissue. *Genes & Development.* 2004;18(16):1976–80

Jager, J., Corcelle, V., Grémeaux, T., Laurent, K., Waget, a, Pagès, G., ... Tanti, J. F. Deficiency in the extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK1) protects leptin-deficient mice from insulin resistance without affecting obesity. *Diabetologia*. 2011;54(1):180–9

Jamal, Z., Martin, A., Gomez-Muñoz, A., Brindley, D. N. Plasma membrane fractions from rat liver contain a phosphatidate phosphohydrolase distinct from that in the endoplasmic reticulum and cytosol. *The Journal of Biological Chemistry*. 1991; 266(5), 2988–96

Janeway, C. A., & Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*. 2002;20(2):197–216

Jeong, Y.-T., Kim, Y. D., Jung, Y.-M., Park, D.-C., Lee, D.-S., Ku, S.-K., ... Chang, H. W. Low molecular weight fucoidan improves endoplasmic reticulum stress-reduced insulin sensitivity through AMP-activated protein kinase activation in L6 myotubes and restores lipid homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Molecular Pharmacology*. 2013;84(1):147–57

Jialal, I., Kaur, H., Devaraj, S. Toll-like receptor status in obesity and metabolic syndrome: a translational perspective. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(1):39-48

Jové, M., Laguna, J. C., Vázquez-Carrera, M. Agonist-induced activation releases peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta from its inhibition by palmitate-induced nuclear factor-kappaB in skeletal muscle cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2005;1734(1):52–61

Jové, M., Planavila, A., Sánchez, R. M., Merlos, M., Laguna, J. C., Vázquez-Carrera, M. Palmitate induces tumor necrosis factor-alpha expression in C2C12 skeletal muscle cells by a mechanism involving protein kinase C and nuclear factor-kappaB activation. *Endocrinology*. 2006;147(1):552–61

Jové, M., Salla, J., Planavila, A., Cabrero, A., Michalik, L., Wahli, W., ... Vázquez-Carrera, M. Impaired expression of NADH dehydrogenase subunit 1 and PPARgamma coactivator-1 in skeletal muscle of ZDF rats: restoration by troglitazone. *Journal of Lipid Research*. 2004;45(1):113–23

Kammoun, H.L., Chabanon, H., Hainault, I., Luquet, S., Magnan, C., Koike, T., ... Foufelle F. GRP78 expression inhibits insulin and ER stress-induced SREBP-1c activation and reduces hepatic steatosis in mice. *J Clin Invest*. 2009;119(5):1201-15

Kampf, J. P., Cupp, D., Kleinfeld, A. M. Different mechanisms of free fatty acid flip-flop and dissociation revealed by temperature and molecular species dependence of transport across lipid vesicles. *The Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(30):21566–74

Kaneto, H., Nakatani, Y., Miyatsuka, T., Kawamori, D., Matsuoka, T., Matsuhisa, M., ... Hori, M. Possible novel therapy for diabetes with cell-permeable JNK-inhibitory peptide. *Nature Medicine*. 2004;10(10):1128–32

Kang, K., Reilly, S., Karabacak, V. Adipocyte-derived Th2 cytokines and myeloid PPAR δ regulate macrophage polarization and insulin sensitivity. *Cell Metabolism*. 2008;7(6):485–495

Kang, R., & Tang, D. PKR-dependent inflammatory signals. *Science Signaling*. 2012;5(247):pe47

Kars M, Yang L, Gregor MF, Mohammed BS, Pietka TA, Finck BN, Patterson BW, Horton JD, Mittendorfer B, Hotamisligil GS, Klein S. Tauroursodeoxycholic Acid may improve liver and muscle but not adipose tissue insulin sensitivity in obese men and women. *Diabetes*. 2010;59(8):1899-905

Kastorini, C.-M., Milionis, H. J., Esposito, K., Giugliano, D., Goudevenos, J. A., Panagiotakos, D. B. The effect of Mediterranean diet on metabolic syndrome and its components: a meta-analysis of 50 studies and 534,906 individuals. *Journal of the American College of Cardiology*. 2011;57(11):1299–313

Kawai, M., Jin, M., Nishimura, J., Dewa, Y., Saegusa, Y., Matsumoto, S., ... Mitsumori, K. Hepatocarcinogenic Susceptibility of Fenofibrate and Its Possible Mechanism of Carcinogenicity in a Two-Stage Hepatocarcinogenesis Model of rasH2 Mice. *Toxicologic Pathology*. 2008;36(7):950–957

Kelley, D.E., Mokan, M., Simoneau, J.A., Mandarino, L.J. Interaction between glucose and free fatty acid metabolism in human skeletal muscle. *J Clin Invest*. 1993;92(1):91-8

Kemp, B.E., Stapleton, D., Campbell, D.J., Chen, Z.P., Murthy, S., Walter, M., ... Witters, L.A. AMP-activated protein kinase, super metabolic regulator. *Biochem Soc Trans*. 2003;31(1):162-8

Kerner, J., & Hoppel, C. Fatty acid import into mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2000;1486(1):1–17

Keys, A., Fidanza, F., Karvonen, M.J., Kimura, N., Taylor, H.L. Indices of relative weight and obesity. *J Chronic Dis*. 1972;25(6):329-43

Kharroubi, I., Ladrière, L., Cardozo, A. K., Dogusan, Z., Cnop, M., Eizirik, D. L. Free fatty acids and cytokines induce pancreatic beta-cell apoptosis by different mechanisms: role of nuclear factor-kappaB and endoplasmic reticulum stress. *Endocrinology*. 2004;145(11): 5087–96

Kim AH, Khursigara G, Sun X, Franke TF, Chao MV. Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol Cell Biol*. 2001;21(3):893-901

Kim, H.-J., Higashimori, T., Park, S.-Y., Choi, H., Dong, J., Kim, Y.-J., ... Kim, J. K. Differential effects of interleukin-6 and -10 on skeletal muscle and liver insulin action in vivo. *Diabetes*. 2004;53(4):1060–7

Kim, H.J., Park, K.G., Yoo, E.K., Kim, Y.H., Kim, Y.N., Kim, H.S, ... Lee IK. Effects of PGC-1alpha on TNF-alpha-induced MCP-1 and VCAM-1 expression and NF-kappaB activation in human aortic smooth muscle and endothelial cells. *Antioxid Redox Signal*. 2007;9(3):301-7

Kim, K.H. Regulation of mammalian acetyl-coenzyme A carboxylase. *Annual Review of Nutrition*. 1997;17:77-99

Klement, J. F., Rice, N. R., Car, B. D., Abbondanzo, S. J., Powers, G. D., Bhatt, P. H., ... Stewart, C. L. I κ B deficiency results in a sustained NF- κ B response and severe widespread dermatitis in mice. *Molecular and Cellular Biology*. 1996;16(5):2341–9

Klip A, Pâquet MR. Glucose transport and glucose transporters in muscle and their metabolic regulation. *Diabetes Care*. 1990;13(3):228-43

Klover, P. J., Zimmers, T. A., Koniaris, L. G., Mooney, R. A. Chronic exposure to interleukin-6 causes hepatic insulin resistance in mice. *Diabetes*. 2003;52(11):2784–9

Knobler, H. Tumor necrosis factor- α -induced insulin resistance may mediate the hepatitis C virus–diabetes association. *The American Journal of Gastroenterology*. 2003;98(12):2751–2756

Ko HJ, Zhang Z, Jung DY, Jun JY, Ma Z, Jones KE, ... Kim JK. Nutrient stress activates inflammation and reduces glucose metabolism by suppressing AMP-activated protein kinase in the heart. *Diabetes*. 2009;58(11):2536-46

Kobayashi Y, Furukawa-Hibi Y, Chen C, Horio Y, Isobe K, Ikeda K, Motoyama N. SIRT1 is critical regulator of FOXO-mediated transcription in response to oxidative stress. *Int J Mol Med*. 2005;16(2):237-43

Könner, A. C., & Brüning, J. C. Toll-like receptors: linking inflammation to metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*. 2011;22(1):16–23

Krakauer, N. Y., & Krakauer, J. C. A new body shape index predicts mortality hazard independently of body mass index. *PloS One*. 2012;7(7):e39504

Krämer, D. K., Al-Khalili, L., Guigas, B., Leng, Y., Garcia-Roves, P. M., Krook, A. Role of AMP kinase and PPAR δ in the regulation of lipid and glucose metabolism in human skeletal muscle. *The Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(27):19313–20

Kumar, H., Kawai, T., Akira, S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009;388(4):621–5

Lang, F., Cacicedo, J. M., Ruderman, N., Ido, Y. 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*. 2008;283(41):27628–35

LeBrasseur, N.K., Kelly, M., Tsao, T.S., Farmer, S.R., Saha, A.K., Ruderman, N.B., Tomas, E. Thiazolidinediones can rapidly activate AMP-activated protein kinase in mammalian tissues. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006;291(1):E175-81

Lee, A., Scapa, E., Cohen, D., Glimcher, L. Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1. *Science*. 2008;320(5882):1492–1496

Lee, A.-H., Heidtman, K., Hotamisligil, G. S., Glimcher, L. H. Dual and opposing roles of the unfolded protein response regulated by IRE1 α and XBP1 in proinsulin processing and insulin secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011a;108(21):8885–90

- Lee, D. P., Deonarine, A. S., Kienetz, M., Zhu, Q., Skrzypczak, M., Chan, M., Choy, P. C. A novel pathway for lipid biosynthesis: the direct acylation of glycerol. *Journal of Lipid Research*. 2001;42(12):1979–86
- Lee, E. K., Jeong, J. U., Chang, J. W., Yang, W. S., Kim, S. B., Park, S. K., ... Lee, S. K. Activation of AMP-activated protein kinase inhibits albumin-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis through inhibition of reactive oxygen species. *Nephron. Experimental Nephrology*. 2012;121(1-2):e38–48
- Lee, J., & Ozcan, U. Unfolded protein response signaling and metabolic diseases. *The Journal of Biological Chemistry*. 2014;289(3):1203–11
- Lee, J., Sun, C., Zhou, Y., Lee, J., Gokalp, D., Herrema, H., ... Ozcan, U. p38 MAPK-mediated regulation of Xbp1s is crucial for glucose homeostasis. *Nature Medicine*. 2011b;17(10):1251–60
- Lendoye, E., Sibille, B., Rousseau, A-S., Murdaca, J., Grimaldi, P. A., Lopez, P. PPARbeta activation induces rapid changes of both AMPK subunit expression and AMPK activation in mouse skeletal muscle. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*. 2011;25(9):1487–98
- Lerner, A. G., Upton, J.-P., Praveen, P. V. K., Ghosh, R., Nakagawa, Y., Igbaria, A., ... Papa, F. R. IRE1 α induces thioredoxin-interacting protein to activate the NLRP3 inflammasome and promote programmed cell death under irremediable ER stress. *Cell Metabolism*. 2012; 16(2), 250–64
- Li, Y., Xu, S., Giles, A., Nakamura, K., Lee, J. W., Hou, X., ... Zang, M. Hepatic overexpression of SIRT1 in mice attenuates endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in the liver. *FASEB Journal Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2011;25(5):1664–79
- Lim, J.-H., Gerhart-Hines, Z., Dominy, J. E., Lee, Y., Kim, S., Tabata, M., ... Puigserver, P. Oleic acid stimulates complete oxidation of fatty acids through protein kinase A-dependent activation of SIRT1-PGC1 α complex. *The Journal of Biological Chemistry*. 2013;288(10):7117–26
- Lin, L., Hron, J. D., Peng, S. L. Regulation of NF-kappaB, Th activation, and autoinflammation by the forkhead transcription factor Foxo3a. *Immunity*. 2004;21(2):203–13
- Lin, W., Harding, H. P., Ron, D., Popko, B. Endoplasmic reticulum stress modulates the response of myelinating oligodendrocytes to the immune cytokine interferon-gamma. *The Journal of Cell Biology*. 2005;169(4):603–12
- Lisbona, F., Rojas-Rivera, D., Thielen, P. BAX inhibitor-1 is a negative regulator of the ER stress sensor IRE1 α . *Molecular Cell*. 2009;33(6):679–691
- Listenberger, L. L., Han, X., Lewis, S. E., Cases, S., Farese, R. V, Ory, D. S., Schaffer, J. E. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(6):3077–82

Liu, X., & Ntambi, J. M. Atherosclerosis: keep your macrophages in shape. *Nature Medicine*. 2009;15(12):1357–8

Lottenberg, A. M., Afonso, M. D. S., Lavrador, M. S. F., Machado, R. M., Nakandakare, E. R. The role of dietary fatty acids in the pathology of metabolic syndrome. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2012;23(9):1027–40

Lu, B., Nakamura, T., Inouye, K., Li, J., Tang, Y., Lundbäck, P., ... Tracey, K. J. Novel role of PKR in inflammasome activation and HMGB1 release. *Nature*. 2012a;488(7413):670–4

Lu, J., Wang, Q., Huang, L., Dong, H., Lin, L., Lin, N., ... Tan, J. Palmitate causes endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human mesenchymal stem cells: prevention by AMPK activator. *Endocrinology*. 2012b;153(11): 5275–84

Lu, P. D., Harding, H. P., Ron, D. Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. *The Journal of Cell Biology*. 2004;167(1):27–33

Luiken, J.J., Dyck, D.J., Han, X.X., Tandon, N.N., Arumugam, Y., Glatz, J.F., Bonen, A. Insulin induces the translocation of the fatty acid transporter FAT/CD36 to the plasma membrane. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002;282(2):E491-5

Luiken, J. J., Turcotte, L. P., Bonen, A. Protein-mediated palmitate uptake and expression of fatty acid transport proteins in heart giant vesicles. *Journal of Lipid Research*. 1999;40(6):1007–16

Luquet, S., Lopez-Soriano, J., Holst, D., Fredenrich, A., Melki, J., Rassoulzadegan, M., Grimaldi, P.A. Peroxisome proliferator-activated receptor delta controls muscle development and oxidative capability. *FASEB J*. 2003;17(15):2299-301

Lytton, J., Westlin, M., Hanley, M. R. Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *The Journal of Biological Chemistry*. 1991;266(26):17067–71

Ma, K., Vattem, K. M., Wek, R. C. Dimerization and release of molecular chaperone inhibition facilitate activation of eukaryotic initiation factor-2 kinase in response to endoplasmic reticulum stress. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(21):18728–35

Macrae, K., Stretton, C., Lipina, C., Blachnio-Zabielska, A., Baranowski, M., Gorski, J., ... Hundal, H. S. Defining the role of DAG, mitochondrial function, and lipid deposition in palmitate-induced proinflammatory signaling and its counter-modulation by palmitoleate. *Journal of Lipid Research*. 2013;54(9):2366–78

Maedler, K., Sergeev, P., Ris, F., Oberholzer, J., Joller-Jemelka, H.I., Spinas, G.A., ... Donath MY. Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J Clin Invest*. 2002;110(6):851-60

Malhotra, J. D., & Kaufman, R. J. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxidants & Redox Signaling*. 2007;9(12):2277–93

- Mandl, J., Mészáros, T., Bánhegyi, G., Hunyady, L., Csala, M. Endoplasmic reticulum: nutrient sensor in physiology and pathology. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*. 2009;20(4):194–201
- Marciniak, S.J., Ron, D. Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiol Rev*. 2006;86(4):1133-49
- Martínez-Agustin, O., Hernández-Morante, J. J., Martínez-Plata, E., Sánchez de Medina, F., Garaulet, M. Differences in AMPK expression between subcutaneous and visceral adipose tissue in morbid obesity. *Regulatory Peptides*. 2010;163(1-3):31–6
- Martino, M. B., Jones, L., Brighton, B., Ehre, C., Abdulah, L., Davis, C. W., ... Ribeiro, C. M. P. The ER stress transducer IRE1 β is required for airway epithelial mucin production. *Mucosal Immunology*. 2013; 6(3):639–54
- Martinson, F., Chen, X., Lee, A., Glimcher, L. Toll-like receptor activation of XBP1 regulates innate immune responses in macrophages. *Nature Immunology*. 2010;11(5):411–418
- Mata M., Cos F.X., Morros, R., Diego L., Barrot J., Berengué M., ... Vallès J.A. Abordatge de la diabetis mellitus tipus 2 [en línia]. 2a ed. Barcelona: Institut Català de la Salut, 2013 (Guies de pràctica clínica i material docent, núm. 15)
- Mathers, J., Fraser, J.A., McMahon, M., Saunders, R.D., Hayes, J.D., McLellan, L.I. Antioxidant and cytoprotective responses to redox stress. *Biochem Soc Symp*. 2004;(71):157-76
- Mayneris-Perxachs, J., Sala-Vila, A., Chisaguano, M., Castellote, A. I., Estruch, R., Covas, M. I., ... López-Sabater, M. C. Effects of 1-year intervention with a mediterranean diet on plasma Fatty acid composition and metabolic syndrome in a population at high cardiovascular risk. *PloS One*. 2014; 9(3):e85202
- Melloul, D., Marshak, S., Cerasi, E. Regulation of insulin gene transcription. *Diabetologia*. 2002;45(3):309-26
- Michalczyk, I., Sikorski, A. F., Kotula, L., Junghans, R. P., Dubielecka, P. M. The emerging role of protein kinase C θ in cytoskeletal signaling. *Journal of Leukocyte Biology*. 2013;93(3):319–27
- Montell, E., Turini, M., Marotta, M., Roberts, M., Noé, V., Ciudad, C. J., ... Gómez-Foix, a M. DAG accumulation from saturated fatty acids desensitizes insulin stimulation of glucose uptake in muscle cells. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*. 2001;280(2):E229–37
- Moraes, L. A., Piqueras, L., Bishop-Bailey, D. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. *Pharmacology & Therapeutics*. 2006;110(3):371–85
- Mortensen B, Poulsen P, Wegner L, Stender-Petersen KL, Ribel-Madsen R, Friedrichsen M, ... Wojtaszewski JF. Genetic and metabolic effects on skeletal muscle AMPK in young and older twins. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;297(4):E956-64

Mu, J., Brozinick, J. T., Valladares, O., Bucan, M., Birnbaum, M. J. A role for AMP-activated protein kinase in contraction- and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle. *Molecular Cell*. 2001;7(5):1085–94

Muse, E. D., Obici, S., Bhanot, S., Monia, B. P., Mckay, R. A., Rajala, M. W., ... Rossetti, L. Role of resistin in diet-induced hepatic insulin resistance. *J Clin Invest*. 2004;114(2):232-9

Myers, M. G., Backer, J. M., Sun, X. J., Shoelson, S., Hu, P., Schlessinger, J., ... White, M. F. IRS-1 activates phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with src homology 2 domains of p85. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(21):10350–4

Nakae, J., Kitamura, T., Kitamura, Y., Biggs, W. H., Arden, K. C., Accili, D. The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation. *Developmental Cell*. 2003;4(1):119–29

Nakamura, M. T., Yudell, B. E., Loor, J. J. Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. *Progress in Lipid Research*. 2014; 53:124–144

Nakamura, T., Furuhashi, M., Li, P., Cao, H. Double-stranded RNA-dependent protein kinase links pathogen sensing with stress and metabolic homeostasis. *Cell*. 2010;140(3):1–19

Nakatani, Y., Kaneto, H., Kawamori, D., Yoshiuchi, K., Hatazaki, M., Matsuoka, T., ... Matsuhisa, M. Involvement of endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(1):847–51

Narkar, V., Downes, M., Yu, R., Emblar, E. AMPK and PPAR δ agonists are exercise mimetics. *Cell*. 2008;134(3):405–415

Nguyen, M. T. A., Faveyukis, S., Nguyen, A.-K., Reichart, D., Scott, P. a, Jenn, A., ... Olefsky, J. M. 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. *The Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(48):35279–92

Nguyen, P., Leray, V., Diez, M., Serisier, S., Le Bloc'h, J., Siliart, B., Dumon, H. Liver lipid metabolism. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 2008;92(3):272–83

Nickerson, J. G., Alkhateeb, H., Benton, C. R., Lally, J., Nickerson, J., Han, X.-X., ... Bonen, A. Greater transport efficiencies of the membrane fatty acid transporters FAT/CD36 and FATP4 compared with FABPpm and FATP1 and differential effects on fatty acid esterification and oxidation in rat skeletal muscle. *The Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(24):16522–30

Nishitoh H, Matsuzawa A, Tobiume K, Saegusa K, Takeda K, Inoue K, ... Ichijo H. ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev*. 2002;16(11):1345-55

Oberkofler, H., Pfeifenberger, A., Soyal, S., Felder, T., Hahne, P., Miller, K., ... Patsch, W. Aberrant hepatic TRIB3 gene expression in insulin-resistant obese

humans. *Diabetologia*. 2010; 53(9):1971–5

Odegaard, J., & Ricardo-Gonzalez, R. Alternative M2 activation of Kupffer cells by PPAR δ ameliorates obesity-induced insulin resistance. *Cell Metabolism*. 2008;7(6):496–507

Ohoka, N., Yoshii, S., Hattori, T., Onozaki, K., Hayashi, H. TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death. *The EMBO Journal*. 2005;24(6):1243–55

Olefsky, J. M., & Glass, C. K. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annual review of physiology*. 2010;72:219–46)

Osowski, C., & Hara, T. Thioredoxin-interacting protein mediates ER stress-induced β cell death through initiation of the inflammasome. *Cell Metabolism*. 2012;16(2):265–273

Oyadomari, S., Koizumi, A., Takeda, K., Gotoh, T., Akira, S., Araki, E., Mori, M. Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes. *J Clin Invest*. 2002;109(4):525-32

Ozawa, K., Miyazaki, M., Matsuhisa, M., Takano, K., Nakatani, Y., Hatazaki, M., ... Ogawa, S. The endoplasmic reticulum chaperone improves insulin resistance in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2005;54(3):657-63

Ozcan, L., & Tabas, I. Role of endoplasmic reticulum stress in metabolic disease and other disorders. *Annu Rev Med*. 2012;63:317-28

Ozcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A.-H., Iwakoshi, N. N., Ozdelen, E., ... Hotamisligil, G. S. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science (New York, N.Y.)*. 2004;306(5695):457–61

Ozcan, U., Yilmaz, E., Ozcan, L., Furuhashi, M., Vaillancourt, E., Smith, R. O., ... Hotamisligil, G. S. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science (New York, N.Y.)*. 2006;313(5790):1137–40

Pal, D., Dasgupta, S., Kundu, R., Maitra, S., Das, G., Mukhopadhyay, S., ... Bhattacharya, S. Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance. *Nature Medicine*. 2012;18(8):1279–85

Palomer, X., Alvarez-Guardia, D., Rodríguez-Calvo, R., Coll, T., Laguna, J. C., Davidson, M. M., ... Vázquez-Carrera, M. TNF-alpha reduces PGC-1alpha expression through NF-kappaB and p38 MAPK leading to increased glucose oxidation in a human cardiac cell model. *Cardiovascular Research*. 2009;81(4):703–12

Palomer X, Capdevila-Busquets E, Botteri G, Salvadó L, Barroso E, Davidson MM, ... Vázquez-Carrera M. PPAR β/δ attenuates palmitate-induced endoplasmic reticulum stress and induces autophagic markers in human cardiac cells. *Int J Cardiol*. 2014;174(1):110-8

Park, S. W., Zhou, Y., Lee, J., Lee, J., Ozcan, U. Sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 2b is a major regulator of endoplasmic reticulum stress and glucose

homeostasis in obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010a;107(45):19320–5

Park, S., Zhou, Y., Lee, J., Lu, A., Sun, C. The regulatory subunits of PI3K, p85 and p85 , interact with XBP-1 and increase its nuclear translocation. *Nature Medicine*. 2010b;16(4):429–437

Peng, G., Li, L., Liu, Y., Pu, J., Zhang, S., Yu, J., ... Liu, P. Oleate blocks palmitate-induced abnormal lipid distribution, endoplasmic reticulum expansion and stress, and insulin resistance in skeletal muscle. *Endocrinology*. 2011;152(6):2206–18

Pérez-Martínez, P., García-Ríos, A., Delgado-Lista, J., Pérez-Jiménez, F., López-Miranda, J. Mediterranean diet rich in olive oil and obesity, metabolic syndrome and diabetes mellitus. *Curr Pharm Des*. 2011;17(8):769-77

Perkins, N. D. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 2007;8(1):49–62

Pessin, J., & Saltiel, A. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*. 2000;106(2):165–169

Peter, A., Weigert, C., Staiger, H., Machicao, F. Individual stearoyl-coa desaturase 1 expression modulates endoplasmic reticulum stress and inflammation in human myotubes and is associated with skeletal muscle. *Diabetes*. 2009;58:1757–1765

Peters, J., Foreman, J., Gonzalez, F. Dissecting the role of peroxisome proliferator-activated receptor- β/δ (PPAR β/δ) in colon, breast, and lung carcinogenesis. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2011;30:619–640

Pfaffenbach KT, Gentile CL, Nivala AM, Wang D, Wei Y, Pagliassotti MJ. Linking endoplasmic reticulum stress to cell death in hepatocytes: roles of C/EBP homologous protein and chemical chaperones in palmitate-mediated cell death. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010;298(5):E1027-35

Pickersgill, L., Litherland, G. J., Greenberg, A. S., Walker, M., Yeaman, S. J. Key role for ceramides in mediating insulin resistance in human muscle cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(17):12583–9

Polekhina, G., Gupta, A., & Michell, B. AMPK β subunit targets metabolic stress sensing to glycogen. *Current Biology*. 2003;13:867–871

Puthalakath, H., O'Reilly, L. A., Gunn, P., Lee, L., Kelly, P. N., Huntington, N. D., ... Strasser, A. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell*. 2007;129(7): 1337–49

Qatanani, M., & Lazar, M. A. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. *Genes & Development*. 2007;21(12):1443–55

Qiu, Y., Mao, T., Zhang, Y., Shao, M. A Crucial Role for RACK1 in the Regulation of Glucose-Stimulated IRE1 {alpha} Activation in Pancreatic {beta} Cells. *Science*. 2010;3(106):1–20

Raman, M., Chen, W., Cobb, M. H. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*. 2007;26(22):3100–12

Ramirez, T., Tong, M., Chen, W. C., Nguyen, Q.-G., Wands, J. R., de la Monte, S. M. Chronic alcohol-induced hepatic insulin resistance and endoplasmic reticulum stress ameliorated by peroxisome-proliferator activated receptor- δ agonist treatment. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2013;28(1):179–87

Randle, P.J., Garland, P.B., Hales, C.N., Newsholme, E.A. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet*. 1963;1(7285):785-9

Reed, K. R., Sansom, O. J., Hayes, A. J., Gescher, A. J., Winton, D. J., Peters, J. M., Clarke, A. R. PPAR δ status and Apc-mediated tumourigenesis in the mouse intestine. *Oncogene*. 2004;23(55):8992–6

Reshef, L., Olswang, Y., Cassuto, H., Blum, B., Croniger, C. M., Kalhan, S. C., ... Hanson, R. W. Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(33):30413–6

Reyna, S., Ghosh, S., Tantiwong, P. Elevated toll-like receptor 4 expression and signaling in muscle from insulin-resistant subjects. *Diabetes*. 2008;57:2595–2602

Rieusset, J., Chauvin, M.-A., Durand, A., Bravard, A., Laugerette, F., Michalski, M.-C., Vidal, H. Reduction of endoplasmic reticulum stress using chemical chaperones or Grp78 overexpression does not protect muscle cells from palmitate-induced insulin resistance. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2012;417(1):439–45

Rioux, V., & Legrand, P. Saturated fatty acids: simple molecular structures with complex cellular functions. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 2007;10(6):752–8

Risérus U, Sprecher D, Johnson T, Olson E, Hirschberg S, Liu A, ... Karpe F. 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*. 2008;57(2):332-9

Robertson, R. P. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *The Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(41): 42351–4

Roden, M., Price, T.B., Perseghin, G., Petersen, K.F., Rothman, D.L., Cline, G.W., Shulman, G.I. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest*. 1996;97(12):2859-65

Rodríguez-Calvo R, Serrano L, Coll T, Moullan N, Sánchez RM, Merlos M, ... Vázquez-Carrera M. 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(8):2149-57

Roglans, N. Fibrate treatment does not modify the expression of acyl coenzyme A oxidase in human liver. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2002;72(6):692–701

Ron, D., & Walter, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 2007;8(7):519–29

Rosse, C., Linch, M., Kermorgant, S., Cameron, A. J. M., Boeckeler, K., & Parker, P. J. PKC and the control of localized signal dynamics. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 2010;11(2):103–12

Saghizadeh M, Ong JM, Garvey WT, Henry RR, Kern PA. The expression of TNF alpha by human muscle. Relationship to insulin resistance. *J Clin Invest*. 1996;97(4):1111-6

Salas-Salvadó, J., Bulló, M., Estruch, R., Ros, E., Covas, M.I., Ibarrola-Jurado, N., ... Martínez-González, M.A. Prevention of diabetes with Mediterranean diets: a subgroup analysis of a randomized trial. *Ann Intern Med*. 2014;160(1):1-10

Salminen, A., Hyttinen, J. M. T., Kaarniranta, K. AMP-activated protein kinase inhibits NF- κ B signaling and inflammation: impact on healthspan and lifespan. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*. 2011;89(7):667–76

Saltiel, A., & Kahn, C. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001;414(6865):799–806

Saltiel, A. R. Insulin Resistance in the Defense against Obesity. *Cell Metabolism*. 2012;15(6):798–804

Salvadó, L., Serrano-Marco, L., Barroso, E., Palomer, X., Vázquez-Carrera, M. Targeting PPAR β/δ for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Expert Opin Ther Targets*. 2012;16(2):209-23

Sanders, M. J., Grondin, P. O., Hegarty, B. D., Snowden, M. A., Carling, D. Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade. *The Biochemical Journal*. 2007;403(1):139–48

Sano, H., Kane, S., Sano, E., Míinea, C. P., Asara, J. M., Lane, W. S., ... Lienhard, G. E. Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(17):14599–602

Sarbassov, D. D., Guertin, D. a, Ali, S. M., Sabatini, D. M. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science (New York, N.Y.)*. 2005;307(5712): 1098–101

Schaeffler, A., Gross, P., Buettner, R., Bollheimer, C., Buechler, C., Neumeier, M., ... Falk, W. Fatty acid-induced induction of Toll-like receptor-4/nuclear factor-kappaB pathway in adipocytes links nutritional signalling with innate immunity. *Immunology*. 2009;126(2):233–45

Schmitz-Peiffer, C. Ceramide Generation Is Sufficient to Account for the Inhibition of the Insulin-stimulated PKB Pathway in C2C12 Skeletal Muscle Cells Pretreated with Palmitate. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(34):24202–24210

Serrano-Marco, L., Barroso, E., El Kochairi, I., Palomer, X., Michalik, L., Wahli, W., Vázquez-Carrera, M. The peroxisome proliferator-activated receptor PPAR agonist GW501516 inhibits IL 6 induced signal transducer and activator of transcription 3 STAT3 activation and insulin resistance in human liver cells. *Diabetologia*. 2012;55(3):743–51

Serrano-Marco, L., Rodríguez-Calvo, R., El Kochairi, I., Palomer, X., Michalik, L., Wahli, W., Vázquez-Carrera, M. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- β/δ (PPAR- β/δ) ameliorates insulin signaling and reduces SOCS3 levels by inhibiting STAT3 in interleukin-6-stimulated adipocytes. *Diabetes*. 2011;60(7):1990–9

Sha, H., He, Y., Yang, L., Qi, L. Stressed out about obesity: IRE1 α -XBP1 in metabolic disorders. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*. 2011;22(9):374–81

Shaw, R., Lamia, K., Vasquez, D., Koo, S. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science*. 2005;310(5754):1642–1646

Shen, J., Chen, X., Hendershot, L., Prywes, R. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Developmental Cell*. 2002;3(1):99–111

Shepherd, P.R. & Kahn, B.B. Glucose transporters and insulin action--implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1999;341(4):248-57

Shi, H., Kokoeva, M.V., Inouye, K., Tzamelis, I., Yin, H., Flier, J.S. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006;116(11):3015-25

Shoelson, S.E., Lee, J., Goldfine, A.B. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006;116(7):1793-801

Shoelson SE, Lee J, Yuan M. Inflammation and the IKK beta/I kappa B/NF-kappa B axis in obesity- and diet-induced insulin resistance. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2003;27 Suppl 3:S49-52

Shulman, G. Cellular mechanisms of insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*. 2000;106(2):171–176

Sinclair DA, Guarente L. Unlocking the secrets of longevity genes. *Sci Am*. 2006;294(3):48-51, 54-7

Solinas, G., & Karin, M. JNK1 and IKKbeta: molecular links between obesity and metabolic dysfunction. *FASEB Journal Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2010;24(8):2596–611

Song B, Scheuner D, Ron D, Pennathur S, Kaufman RJ. Chop deletion reduces oxidative stress, improves beta cell function, and promotes cell survival in multiple mouse models of diabetes. *J Clin Invest*. 2008;118(10):3378-89

Souza, S. C., Palmer, H. J., Kang, Y. H., Yamamoto, M. T., Muliro, K. V, Paulson, K. E., Greenberg, A. S. TNF-alpha induction of lipolysis is mediated through activation of the extracellular signal related kinase pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2003;89(6):1077–86

- Sparks LM, Bosma M, Brouwers B, van de Weijer T, Bilet L, Schaart G, ... Schrauwen P. Reduced incorporation of fatty acids into triacylglycerol in myotubes from obese individuals with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2014;63(5):1583-93
- Spiegelman BM. PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes*. 1998;47(4):507-14
- Srivastava, R. A. K., Pinkosky, S. L., Filippov, S., Hanselman, J. C., Cramer, C. T., Newton, R. S. AMP-activated protein kinase: an emerging drug target to regulate imbalances in lipid and carbohydrate metabolism to treat cardio-metabolic diseases. *Journal of Lipid Research*. 2012;53(12):2490–514
- Stahl, a, Hirsch, D. J., Gimeno, R. E., Punreddy, S., Ge, P., Watson, N., ... Lodish, H. F. Identification of the major intestinal fatty acid transport protein. *Molecular Cell*. 1999;4(3):299–308
- Staiger, H., Staiger, K., Stefan, N., Wahl, H. G., Machicao, F., Kellner, M., Häring, H.-U. Palmitate-induced interleukin-6 expression in human coronary artery endothelial cells. *Diabetes*. 2004;53(12):3209–16
- Steensberg, A., Febbraio, M. A., Osada, T., Schjerling, P., van Hall, G., Saltin, B., Pedersen, B. K. Interleukin-6 production in contracting human skeletal muscle is influenced by pre-exercise muscle glycogen content. *The Journal of Physiology*. 2001;537(Pt 2):633–9
- Steinberg, G. R., Michell, B. J., van Denderen, B. J. W., Watt, M. J., Carey, A. L., Fam, B. C., ... Kemp, B. E. Tumor necrosis factor alpha-induced skeletal muscle insulin resistance involves suppression of AMP-kinase signaling. *Cell Metabolism*. 2006;4(6):465–74
- Stone, S. J., Myers, H. M., Watkins, S. M., Brown, B. E., Feingold, K. R., Elias, P. M., Farese, R. V. Lipopenia and skin barrier abnormalities in DGAT2-deficient mice. *The Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(12):11767–76
- St-Pierre, J., Lin, J., Krauss, S., Tarr, P. T., Yang, R., Newgard, C. B., Spiegelman, B. M. Bioenergetic analysis of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivators 1alpha and 1beta (PGC-1alpha and PGC-1beta) in muscle cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(29):26597–603
- Strowig, T., Henao-Mejia, J., Elinav, E., Flavell, R. Inflammasomes in health and disease. *Nature*. 2012;481(7381):278–86
- Sul, H.S., Latasa, M.J., Moon, Y., Kim, K.H. Regulation of the fatty acid synthase promoter by insulin. *J Nutr*. 2000;130(2S Suppl):315S-320S
- Summers, S. A. Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Progress in Lipid Research*. 2006;45(1):42–72
- Sun, X.J., Wang, L.M., Zhang, Y., Yenush, L., Myers, M.G. Jr., Glasheen, E., Lane, W.S., Pierce, J.H., White, M.F. Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature*. 1995;377(6545):173-7
- Sun, Y., Ren, M., Gao, G.Q., Gong, B., Xin, W., Guo, H., ... Zhao, J.J. Chronic palmitate exposure inhibits AMPKalpha and decreases glucose-stimulated insulin

secretion from beta-cells: modulation by fenofibrate. *Acta Pharmacol Sin.* 2008;29(4):443-50

Taniguchi, C. M., Emanuelli, B., Kahn, C. R. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology.* 2006;7(2):85–96

Tchernof, A., & Després, J.-P. Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiological Reviews.* 2013;93(1):359–404

Teller, J.K., Fahien, L.A., Valdivia, E. Interactions among mitochondrial aspartate aminotransferase, malate dehydrogenase, and the inner mitochondrial membrane from heart, hepatoma, and liver. *J Biol Chem.* 1990;265(32):19486-94

Terai K, Hiramoto Y, Masaki M, Sugiyama S, Kuroda T, Hori M, ... Hirota H. AMP-activated protein kinase protects cardiomyocytes against hypoxic injury through attenuation of endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol.* 2005;25(21):9554-75

Thuerauf DJ, Arnold ND, Zechner D, Hanford DS, DeMartin KM, McDonough PM, ... Glembocki CC. p38 Mitogen-activated protein kinase mediates the transcriptional induction of the atrial natriuretic factor gene through a serum response element. A potential role for the transcription factor ATF6. *J Biol Chem.* 1998;273(32):20636-43

Timmers, S., Schrauwen, P., de Vogel, J. Muscular diacylglycerol metabolism and insulin resistance. *Physiology & Behavior.* 2008;94(2):242–51

Timmins, J.M., Ozcan, L., Seimon, T.A., Li, G., Malagelada, C., Backs, J., ... Tabas I. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II links ER stress with Fas and mitochondrial apoptosis pathways. *J Clin Invest.* 2009;119(10):2925-41

Torti FM, Dieckmann B, Beutler B, Cerami A, Ringold GM. A macrophage factor inhibits adipocyte gene expression: an in vitro model of cachexia. *Science.* 1985;229(4716):867-9

Tran, H., Brunet, A., Griffith, E.C., Greenberg, M.E. The many forks in FOXO's road. *Science's STKE : Signal Transduction Knowledge Environment.* 2003;2003(172):RE5

Tschopp, O., Yang, Z.-Z., Brodbeck, D., Dummler, B. a, Hemmings-Mieszczak, M., Watanabe, T., ... Hemmings, B. A. Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development (Cambridge, England).* 2005;132(13):2943–54

Turinsky J, O'Sullivan DM, Bayly BP. 1,2-Diacylglycerol and ceramide levels in insulin-resistant tissues of the rat in vivo. *J Biol Chem.* 1990;265(28):16880-5

Unger, R., & Scherer, P. Gluttony, sloth and the metabolic syndrome: a roadmap to lipotoxicity. *Trends in Endocrinology & Metabolism.* 2010;21(6):345–352

Usui, M., Yamaguchi, S., Tanji, Y., Tominaga, R., Ishigaki, Y., Fukumoto, M., ... Ishihara, H. Atf6 α -null mice are glucose intolerant due to pancreatic β -cell failure on a high-fat diet but partially resistant to diet-induced insulin resistance. *Metabolism: Clinical and Experimental.* 2012;61(8):1118–28

Verfaillie, T., Garg, A. D., Agostinis, P. Targeting ER stress induced apoptosis and inflammation in cancer. *Cancer Letters*. 2013;332(2):249–64

Wahli, W., & Michalik, L. PPARs at the crossroads of lipid signaling and inflammation. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*. 2012;23(7):351–63

Walter, P., & Ron, D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science (New York, N.Y.)*. 2011;334(6059):1081–6

Wang, D., Wei, Y., Pagliassotti, M. J. Saturated fatty acids promote endoplasmic reticulum stress and liver injury in rats with hepatic steatosis. *Endocrinology*. 2006;147(2): 943–51

Wang, F., Chen, Y., Ouyang, H. Regulation of unfolded protein response modulator XBP1s by acetylation and deacetylation. *Biochem. J*. 2011a;433(1):245–252

Wang, L., You, J., Zhong, B., Ren, C., Zhang, Y., Li, M., ... Wang, F. Scd1 mammary-specific vector constructed and overexpressed in goat fibroblast cells resulting in an increase of palmitoleic acid and oleic acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2014;443(2):389–94

Wang, S., Zhang, M., Liang, B., Xu, J., Xie, Z., Liu, C., ... Zou, M.-H. AMPK α 2 deletion causes aberrant expression and activation of NAD(P)H oxidase and consequent endothelial dysfunction in vivo: role of 26S proteasomes. *Circulation Research*. 2010;106(6):1117–28

Wang, Y., Vera, L., Fischer, W., Montminy, M. The CREB coactivator CRTC2 links hepatic ER stress and fasting gluconeogenesis. *Nature*. 2009;460(7254):534–537

Wang, Y., Wu, Z., Li, D., Wang, D., Wang, X., Feng, X., Xia, M. Involvement of oxygen-regulated protein 150 in AMP-activated protein kinase-mediated alleviation of lipid-induced endoplasmic reticulum stress. *The Journal of Biological Chemistry*. 2011b;286(13):11119–31

Watson, M. L., Coghlan, M., Hundal, H. S. Modulating serine palmitoyl transferase (SPT) expression and activity unveils a crucial role in lipid-induced insulin resistance in rat skeletal muscle cells. *The Biochemical Journal*. 2009;417(3):791–801

Watt, M. J., Steinberg, G. R., Chen, Z.-P., Kemp, B. E., Febbraio, M. A. Fatty acids stimulate AMP-activated protein kinase and enhance fatty acid oxidation in L6 myotubes. *The Journal of Physiology*. 2006;574(Pt 1):139–47

Wei, Y., Wang, D., Topczewski, F., Pagliassotti, M.J. Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006;291(2):E275-81

Wei, Y., Wang, D., Gentile, C.L., Pagliassotti, M.J. Reduced endoplasmic reticulum luminal calcium links saturated fatty acid-mediated endoplasmic reticulum stress and cell death in liver cells. *Mol Cell Biochem*. 2009;331(1-2):31-40

Wellen, K., & Hotamisligil, G. Inflammation, stress, and diabetes. *Journal of Clinical Investigation*. 2005;115(5):1111–1119

- Wen, H., Gris, D., Lei, Y., Jha, S., Zhang, L., Huang, M. T.-H., ... Ting, J. P.-Y. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nature Immunology*. 2011;12(5):408–15
- Wendell, S.G., Baffi, C., Holguin, F. Fatty acids, inflammation, and asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(5):1255-64
- White, M. F. IRS proteins and the common path to diabetes. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*. 2002;283(3):E413–22
- White, M. F., Shoelson, S. E., Keutmann, H., Kahn, C. R. A cascade of tyrosine autophosphorylation in the beta-subunit activates the phosphotransferase of the insulin receptor. *The Journal of Biological Chemistry*. 1988;263(6):2969–80
- Wijesekara, N., Konrad, D., Eweida, M., Jefferies, C., Liadis, N., Giacca, A., ... Woo M. Muscle-specific Pten deletion protects against insulin resistance and diabetes. *Mol Cell Biol*. 2005;25(3):1135-45
- Wildman, R.P., Muntner, P., Reynolds, K., McGinn, A.P, Rajpathak, S., Wylie-Rosett, J., Sowers, M.R.. The obese without cardiometabolic risk factor clustering and the normal weight with cardiometabolic risk factor clustering: prevalence and correlates of 2 phenotypes among the US population (NHANES 1999-2004). *Arch Intern Med*. 2008;168(15):1617-24
- Winnay, J. N., Boucher, J., Mori, M. a, Ueki, K., Kahn, C. R. A regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase increases the nuclear accumulation of X-box-binding protein-1 to modulate the unfolded protein response. *Nature Medicine*. 2010;16(4):438–45
- Winzell, M. S., Wulff, E. M., Olsen, G. S., Sauerberg, P., Gotfredsen, C. F., Ahrén, B. Improved insulin sensitivity and islet function after PPARdelta activation in diabetic db/db mice. *European Journal of Pharmacology*. 2010;626(2-3):297–305
- Withers, D.J., Gutierrez, J.S., Towery, H., Burks, D.J., Ren, J.M., Previs, S., ... White MF. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature*. 1998;391(6670):900-4
- Wojtaszewski JF, Richter EA. Effects of acute exercise and training on insulin action and sensitivity: focus on molecular mechanisms in muscle. *Essays Biochem*. 2006;42:31-46
- Wu, H.-T., Chen, W., Cheng, K.-C., Ku, P.-M., Yeh, C.-H., Cheng, J.-T. Oleic acid activates peroxisome proliferator-activated receptor δ to compensate insulin resistance in steatotic cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2012;23(10):1264–70
- Wu, J., Rutkowski, D. T., Dubois, M., Swathirajan, J., Saunders, T., Wang, J., ... Kaufman, R. J. ATF6alpha optimizes long-term endoplasmic reticulum function to protect cells from chronic stress. *Developmental Cell*. 2007a;13(3):351–64
- Wu Q, Ortegon AM, Tsang B, Doege H, Feingold KR, Stahl A. FATP1 is an insulin-sensitive fatty acid transporter involved in diet-induced obesity. *Mol Cell Biol*. 2006;26(9):3455-67

Wu, Y., Song, P., Xu, J., Zhang, M., Zou, M.-H. Activation of protein phosphatase 2A by palmitate inhibits AMP-activated protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry*. 2007b;282(13):9777–88

Xiao C, Giacca A, Lewis GF. Sodium phenylbutyrate, a drug with known capacity to reduce endoplasmic reticulum stress, partially alleviates lipid-induced insulin resistance and beta-cell dysfunction in humans. *Diabetes*. 2011;60(3):918-24

Xue, X., Piao, J.-H., Nakajima, A., Sakon-Komazawa, S., Kojima, Y., Mori, K., ... Nakano, H. Tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) induces the unfolded protein response (UPR) in a reactive oxygen species (ROS)-dependent fashion, and the UPR counteracts ROS accumulation by TNFalpha. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(40):33917–25

Yamaguchi, H., & Wang, H.-G. CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(44):45495–502

Yamamoto, K., Sato, T., Matsui, T., Sato, M., Okada, T., Yoshida, H., ... Mori, K. Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1. *Developmental Cell*. 2007;13(3):365–76

Yang, Q., Graham, T. E., Mody, N., Preitner, F., Peroni, O. D., Zabolotny, J. M., ... Kahn, B. B. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature*. 2005;436(7049):356–62

Yang, X.-D., Tajkhorshid, E., Chen, L.-F. Functional interplay between acetylation and methylation of the RelA subunit of NF-kappaB. *Molecular and Cellular Biology*. 2010a;30(9): 2170–80

Yang, Z., Kahn, B. B., Shi, H., Xue, B.-Z. Macrophage alpha1 AMP-activated protein kinase (alpha1AMPK) antagonizes fatty acid-induced inflammation through SIRT1. *The Journal of Biological Chemistry*. 2010b. 285(25);19051–9

Yang ZH, Miyahara H, Hatanaka A. Chronic administration of palmitoleic acid reduces insulin resistance and hepatic lipid accumulation in KK-Ay Mice with genetic type 2 diabetes. *Lipids Health Dis*. 2011;10:120

Ye, J., Rawson, R., Komuro, R., Chen, X. ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Molecular Cell*. 2000;6:1355–1364

Yeung, F., Hoberg, J. E., Ramsey, C. S., Keller, M. D., Jones, D. R., Frye, R. A., Mayo, M. W. Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *The EMBO Journal*. 2004;23(12);2369–80

Yoon, E.-K., Jeong, Y.-T., Li, X., Song-Cui, Park, D.-C., Kim, Y.-H., ... Hwang, S.-L. Glyceollin improves endoplasmic reticulum stress-induced insulin resistance through CaMKK-AMPK pathway in L6 myotubes. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2013;24(6):1053–61

Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., Mori, K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*. 2001;107(7):881–91

Yu, C., Chen, Y., Cline, G. W., Zhang, D., Zong, H., Wang, Y., ... Shulman, G. I. Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(52):50230–6

Yusta, B., Baggio, L. L., Estall, J. L., Koehler, J. a, Holland, D. P., Li, H., ... Drucker, D. J. GLP-1 receptor activation improves beta cell function and survival following induction of endoplasmic reticulum stress. *Cell Metabolism*. 2006;4(5):391–406

Zhang, C., Kawauchi, J., Adachi, M. T., Hashimoto, Y., Oshiro, S., Aso, T., Kitajima, S. Activation of JNK and transcriptional repressor ATF3/LRF1 through the IRE1/TRAF2 pathway is implicated in human vascular endothelial cell death by homocysteine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2001;289(3):718–24

Zhang, K., & Kaufman, R. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature*. 2008;454(7203):455–462

Zhang DD. Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. *Drug Metab Rev*. 2006;38(4):769-89

Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., ... Moller, D.E. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest*. 2001;108(8):1167-74

Zhou, W., Cao, Q., Peng, Y., Zhang, Q. FoxO4 inhibits NF- κ B and protects mice against colonic injury and inflammation. *Gastroenterology*. 2009;137(4):1403–1414

Zhou, Y., Lee, J., Reno, C., Sun, C., Park, S. Regulation of glucose homeostasis through a XBP-1-FoxO1 interaction. *Nature Medicine*. 2011;17(3):356–365

Zhu, Y. Isolation and Characterization of PBP, a Protein That Interacts with Peroxisome Proliferator-activated Receptor. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272(41):25500–25506

Zinszner, H., Kuroda, M., Wang, X., Batchvarova, N., Lightfoot, R. T., Remotti, H., ... Ron, D. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes & Development*. 1998;12(7):982–95

ANNEX 1

Expert Opinion

1. Introduction
2. Molecular mechanisms of PPAR action
3. Tissue expression and ligands of PPARs
4. PPAR β/δ and type 2 diabetes mellitus
5. Conclusion
6. Expert opinion

informa
healthcare

Targeting PPAR β/δ for the treatment of type 2 diabetes mellitus

Laia Salvadó, Lucía Serrano-Marco, Emma Barroso, Xavier Palomer & Manuel Vázquez-Carrera[†]

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

Introduction: The nuclear receptors Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPAR) α and PPAR γ are therapeutic targets for hypertriglyceridemia and insulin resistance, respectively. Evidence is now emerging that the PPAR β/δ isotype is a potential pharmacological target for the treatment of insulin resistance and type 2 diabetes mellitus.

Areas covered: In this review, the capacity of PPAR β/δ to prevent the development of insulin resistance and type 2 diabetes mellitus is discussed. Special emphasis is placed on preclinical studies and the molecular mechanisms responsible for its actions in the main cell types involved in these pathologies: adipocytes, β -cells, skeletal muscle cells and hepatocytes.

Expert opinion: While several concerns remain for the development of PPAR β/δ agonists, these drugs have demonstrated their efficacy in the treatment of insulin resistance and type 2 diabetes mellitus in preclinical studies, as well as in a few short clinical studies in humans. Although this data is promising, additional studies must be performed to confirm the efficacy and safety of these drugs in the treatment of type 2 diabetes mellitus.

Keywords: fatty acids, IL-6, NF- κ B, PPAR β/δ , STAT-3

Expert Opin. Ther. Targets (2012) 16(2):209-223

1. Introduction

Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) β/δ is a member of the nuclear receptor superfamily of ligand-inducible transcription factors. This nuclear receptor belongs to the PPARs family, which represent in fact a group of three members: PPAR α (Nuclear Receptor 1C, NR1C1, according to current nomenclature) [1], PPAR β/δ (NR1C2; NUC1; FAAR, fatty acid-activated receptor), and PPAR γ (NR1C3). The term “peroxisome proliferators” was coined to designate compounds sharing the common feature of inducing peroxisome proliferation, which was first reported in rats treated with clofibrate in the 1960s [2]. In 1990, Issemann & Green [3] cloned from mouse liver the first receptor activated by these compounds, which they called PPAR α .

The major physiological functions of PPARs result from their activity as transcription factors, modulating the expression of specific target genes [4]. Through this mechanism PPARs regulate lipid metabolism, glucose homeostasis, and cell differentiation, they also control obesity and cancer [4]. In addition, PPARs can regulate inflammation and the immune response [5]. The involvement of PPARs in all these functions depends on their tissue distribution, ligand binding and the recruitment of co-activators or co-repressors.

Article highlights.

- Insulin resistance precedes and predicts the development of type 2 diabetes mellitus, whose prevalence has risen dramatically in both developed and developing countries due to an increase in obesity and sedentary lifestyles.
- PPAR β/δ is a ligand-activated nuclear receptor that modulates the expression of specific target genes and inflammation through DNA-dependent (*trans*-activation) and independent (*trans*-repression) mechanisms, respectively.
- Most preclinical studies show that activators of this nuclear receptor prevent insulin resistance and type 2 diabetes mellitus in skeletal muscle cells, adipocytes, hepatocytes, and improve the function of β -cells.
- Extrapolation of preclinical findings to diabetic patients remains difficult because clinical studies with these drugs are scarce. A great deal of research will be needed on the efficacy and safety of PPAR β/δ activators before they can be considered appropriate for clinical use.

This box summarizes key points contained in the article.

2. Molecular mechanisms of PPAR action

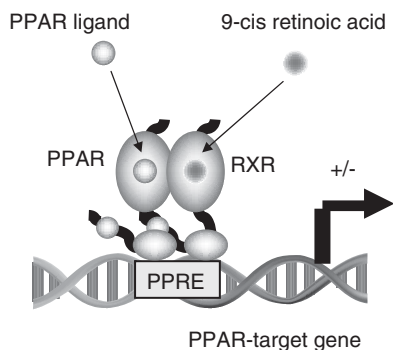
When PPARs heterodimerize with the 9-*cis* retinoic acid receptor (RXR) (NR2B) they become transcriptionally active (Figure 1). PPAR-RXR heterodimers bind to DNA-specific sequences called peroxisome proliferator-response elements (PPREs), which consist of an imperfect direct repeat of the consensus binding 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. Although other orientations are conceivable, binding occurs in such a way that PPAR is oriented to the DNA's 5'-end, while RXR is oriented to the 3'-end. In the absence of an exogenous ligand, high-affinity complexes are formed between PPAR-RXR heterodimers and co-repressor proteins, which block transcriptional activation by sequestering the heterodimer from the promoter. It remains to be determined whether these effects are due to the presence of endogenous ligands.

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 co-activator and co-repressor proteins, etc. One of the best described PPAR co-activators is PPAR γ co-activator 1 α (PGC-1 α). Silencing mediator for retinoic and thyroid hormone receptor (SMRT) and the nuclear receptor co-repressor (NCoR) are co-repressors that interact with the PPARs in the absence of ligands [6]. Receptor-interacting protein 140 (RIP140), an important metabolic regulator, is another ligand-dependent co-repressor which interacts with PPARs. Binding of the ligand to PPAR induces a conformational change

resulting in dissociation of co-repressor proteins, so the PPAR-RXR heterodimer can then bind to PPREs. Moreover, once activated by the ligand, the heterodimer recruits co-activator proteins that promote the initiation of transcription [7]. 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 post-transcriptional level by phosphorylation, ubiquitinylation, and small ubiquitin-related modifier (SUMO)ylation (for a detailed review see references [8,9]). However, the only evidence that any of these changes translate into functional, *in vivo* effects, are limited to the SUMOylation of PPAR γ [10].

However, the regulation of gene transcription by PPARs extends beyond their ability to *trans*-activate 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 [11]. Most of the anti-inflammatory effects of PPARs can probably be explained in this way [12,13]. 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 several main *trans*-repression mechanisms by which ligand-activated PPAR-RXR complexes negatively regulate the activities of other transcription factors. First, *trans*-repression may result from competition for limited amounts of shared co-activators. Under conditions in which the levels of specific co-activators are rate-limiting, activation of PPAR may suppress the activity of other transcription factors that use the same co-activators [14,15]. In a second mechanism, activated PPAR-RXR heterodimers are believed to act through physical interaction with other transcription factors (for example AP-1, NF- κ B, NFAT or STAT). This association prevents the transcription factor from binding to its response element and thereby inhibits its ability to induce gene transcription [16]. A third *trans*-repression 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 [17], which prevents activation of downstream transcription factors. Finally, ligand-dependent SUMOylation of PPAR γ results in its recruitment to the promoters of inflammatory genes where it inhibits transcription by preventing clearance of co-repressor complexes [10]. Although most of the anti-inflammatory effects of PPARs can be explained by *trans*-repression, anti-inflammatory activities based on direct gene regulation through the PPAR α -leukotriene B₄ pathway [18,19] or by regulating I κ B α expression [20] have also been described.

1) Trans-activation



2) Trans-repression

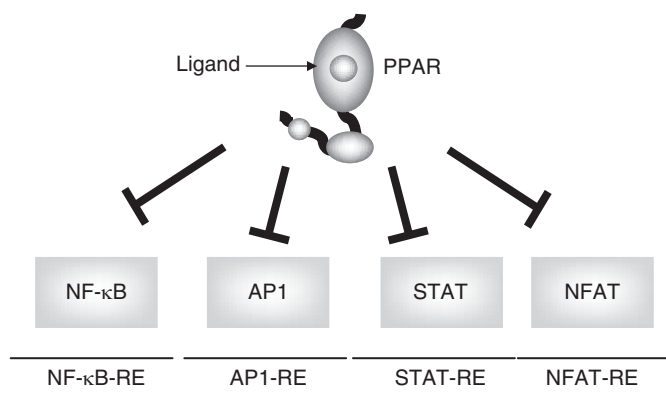


Figure 1. Molecular mechanisms of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs). PPARs are ligand-activated transcription factors that regulate gene expression through two mechanisms: *trans*-activation and *trans*-repression. In transactivation PPAR-RXR heterodimers bind to DNA-specific sequences 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 *trans*-repression. 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, AP-1 activator protein 1 and NFAT nuclear factor of activated T-cells.

3. Tissue expression and ligands of PPARs

PPAR α is predominantly expressed in the liver, heart, brown adipose tissue, kidney, and intestine. Activation of this PPAR isoform increases the catabolism of fatty acids [21,22]. Hence, PPAR α stimulates fatty acid uptake into the cell and subsequent fatty acid import into mitochondria for oxidation, which reduces its ability to be incorporated into plasma lipoproteins carrying triglycerides. In addition, PPAR α reduces plasma triglycerides by increasing lipoprotein lipase and apolipoprotein (apo)A-V, and by repressing the expression of apoC-III, an inhibitor of triglyceride hydrolysis [23,24]. Consequently, fibrates (fenofibrate, bezafibrate), which are synthetic ligands for PPAR α , are used in the treatment of hypertriglyceridemia.

PPAR γ is expressed in white and brown adipose tissue, the gut and immune cells. This PPAR isoform is critical for the differentiation of pre-adipocytes to adipocytes [25,26] and contributes to glucose homeostasis by improving insulin sensitivity [27,28]. Therefore, synthetic PPAR γ agonists (thiazolidinediones or glitazones) are in clinical use as insulin sensitizers to treat patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM).

PPAR β/δ was initially reported as PPAR β in *Xenopus laevis* and NUC1 in humans [29,30]. Later it was cloned from mice and termed PPAR δ or fatty acid-activated receptor (FAAR) [31,32]. Although it was initially unclear whether PPAR β from *Xenopus* and PPAR δ from murine were identical, they are now recognized as homologues and referred to as PPAR β/δ or PPAR δ . In contrast to PPAR α and PPAR γ , which appear to have a more restricted expression pattern,

PPAR β/δ has been reported to show ubiquitous expression, although large individual differences were found for heart and liver [33,34]. It is worth noting that the expression of PPAR β/δ is very high in small intestine and colon as compared to most tissues [33,34].

The crystal structure of the ligand-binding domain of the PPAR β/δ isotype revealed an exceptionally large pocket of approximately 1300 Å³ [29]. This pocket is similar to that of PPAR γ , but much larger than the pockets of other nuclear receptors [35,36]. 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) fatty acids have affinities for PPAR β/δ in the low micromolar range [36-39]. In addition, prostacyclin and fatty acids derived from very low density lipoproteins (VLDL) [40] can activate PPAR β/δ . Although it was initially reported that retinoic acid was a PPAR β/δ ligand [41], subsequent studies ruled out this possibility [42,43]. 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 [44]. 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 [44,45]. Recently, the first PPAR β/δ synthetic antagonist (GSK0660) has been identified [46]. In contrast to PPAR α and PPAR γ , PPAR β/δ agonists are not yet in clinical use.

In vitro and *in vivo* studies using specific PPAR β/δ agonists, tissue-specific over-expression or knockout mouse models have demonstrated a variety of functions of PPAR β/δ in adipose tissue, muscle and skin, and also in inflammation and cancer. Here we will focus on recent advances in our understanding of the role of PPAR β/δ activation as a potential target for the treatment of insulin resistance and T2DM.

4. PPAR β/δ and type 2 diabetes mellitus

Diabetes mellitus (DM) is a chronic disease affecting at least 250 million people worldwide. According to the World Health Organization this figure will be more than double by 2030, with India, China and the USA having the largest numbers of diabetic patients. DM is classified as a metabolic disorder characterized by chronic hyperglycaemia resulting from a defect in insulin secretion or action, or both. T2DM is the most common form, accounting for 90% of all cases. Unlike type 1 diabetic patients, who cannot produce insulin properly, type 2 diabetic patients suffer from a lack of sensitivity to insulin of their body cells, leading to a state of insulin resistance and hyperglycaemia [47]. Although insulin resistance appears early in the pre-diabetic state, the onset of T2DM is ultimately determined by a failure of beta-cell function and the resulting inability to overcome insulin resistance in target tissues [48]. As such, insulin resistance precedes and predicts the development of T2DM [48]. If untreated, diabetes can cause micro- and macrovascular complications such as neuropathy, retinopathy, kidney and heart disease, and other disorders, and in advanced stages it may even lead to kidney failure, amputation, blindness and stroke [49]. The prevalence of T2DM has risen dramatically in both developed and developing countries due to an increase in obesity and sedentary lifestyles. Indeed, epidemiological studies have shown obesity and insulin resistance to be closely related [50]. Furthermore, research over the last decade has found strong links between low-grade chronic inflammation and the presence of obesity, insulin resistance and T2DM. Indeed, several molecules released by adipocytes, such as inflammatory cytokines and free fatty acids (FFAs), trigger inflammatory pathways in several tissues.

4.1 PPAR β/δ effects in adipocytes

The expansion of adipose tissue, mainly in the form of visceral obesity, may exacerbate inflammation in this tissue through several processes. First, macrophages can infiltrate into adipose tissue, which contributes to the overproduction of inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor α (TNF- α) and interleukin 6 (IL-6) [51]. Indeed, the infiltration of macrophages into adipose tissue correlates with the degree of insulin resistance [52]. Second, as visceral fat (which is very sensitive to lipolytic stimuli) increases, so does the rate of lipolysis. This increases FFA mobilization and raises elevated levels of circulating FFAs. Several studies have consistently shown that elevations of plasma

FFA produce insulin resistance in diabetic patients and in non-diabetic subjects [53,54]. Saturated FFAs are potent activators of the toll-like receptor-4 (TLR4) [55], 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 [56]. TLR-4 is expressed in virtually all human cells, and binds a wide spectrum of exogenous and endogenous ligands, including bacterial lipopolysaccharide (LPS) [57]. 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 pro-inflammatory transcription factor NF- κ B [58] and the subsequent enhanced expression of several inflammatory mediators (including IL-6 and monocyte chemoattractant protein-1 [MCP-1]). These observations indicate that saturated FFAs derived from adipocytes and from high-fat diets activate TLR and the inflammatory pathway in adipocytes and macrophages, contributes to the synthesis and production of cytokines such as TNF- α [59]. In addition, high-fat diets raise plasma LPS to a concentration that is high enough to increase body weight, fasting glycemia and inflammation [59]. 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 [59]. Experiments performed in our laboratory have demonstrated that the PPAR β/δ agonist GW501516 inhibited LPS-induced cytokine expression and secretion by preventing NF- κ B activation in adipocytes [60] (Figure 2). Of note, NF- κ B activation by LPS requires MAPK-extracellular signal-related kinase (ERK)1/2 (MEK1/2) activation, since inhibition of this pathway reduces LPS-induced cytokine production in adipocytes [61]. In addition, it has recently been reported that among the differences in visceral adipose tissue that could account for the presence of insulin resistance in morbidly obese individuals compared to paradoxically insulin-sensitive morbidly obese patients, IL-1 β , IL-6, ERK1/2 and NF- κ B play a crucial role [62,63]. Indeed, the authors of that study demonstrated that these are important effectors that mediate the inflammatory effects promoting insulin resistance. In agreement with this role of ERK1/2 and NF- κ B in insulin resistance in adipocytes, we observed increased ERK1/2 phosphorylation and NF- κ B activity and higher expression of IL-6 in white adipose tissue from PPAR β/δ -null mice compared with wild-type mice [60]. 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 by inhibiting ERK1/2, thereby reducing the production of pro-inflammatory cytokines involved in the development of insulin resistance.

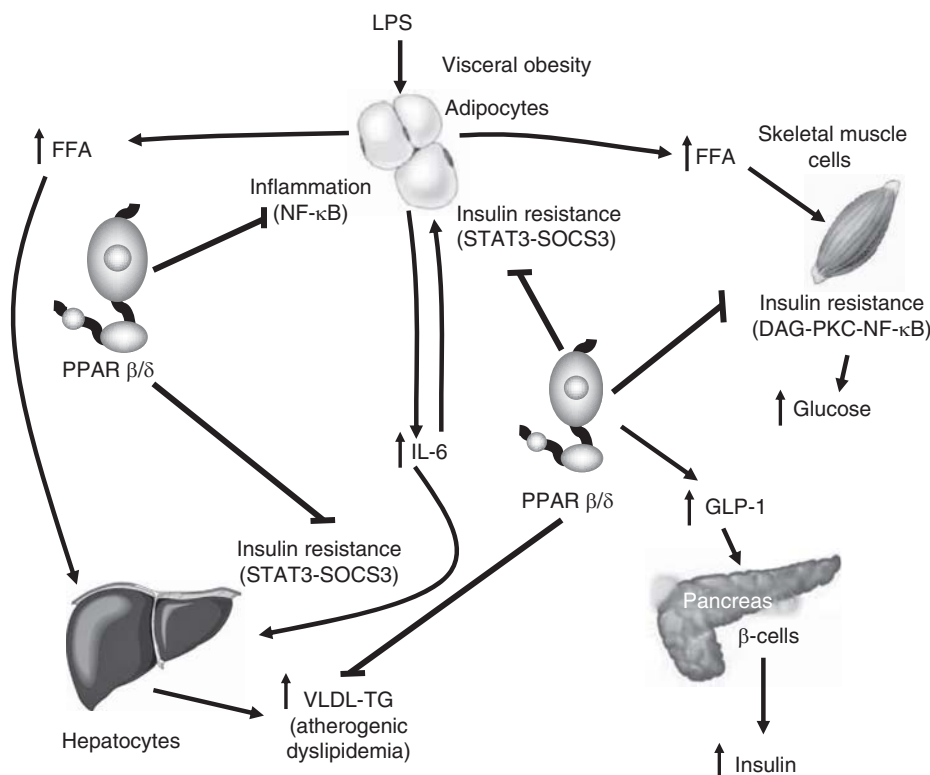


Figure 2. Potential mechanism of action involved in the prevention of insulin resistance and type 2 diabetes mellitus following PPARβ/δ activation.

DAG: Diacylglycerol; FFA: Free fatty acids; GLP-1: Glucagon-like peptide 1; IL-6: Interleukin 6; NF-κB: Nuclear Factor-κB; PKCθ: Protein kinase Cθ; SOCS3: Suppressor of cytokine signaling 3; STAT3: Signal transducer and activator of transcription 3; VLDL-TG: Very low density lipoprotein-triglyceride.

Among the inflammatory mediators released by adipose tissue, increased levels of IL-6 most strongly correlates with obesity and insulin resistance and predicts the development of T2DM [63-65], whereas depletion of IL-6 ameliorates insulin signaling in obese mice [66]. IL-6 signals through a *trans*-membrane receptor complex containing the common signal transducing receptor glycoprotein gp130, which activates Janus tyrosine kinases (Jak1, Jak2, Tyk2), with subsequent Tyr⁷⁰⁵ phosphorylation of STAT3 [67-69]. Phosphorylated STAT3 dimerizes and translocates to the nucleus, where it regulates the transcription of target genes through binding to specific DNA-responsive elements [70]. In addition to activation by Tyr⁷⁰⁵ phosphorylation, STAT3 also requires phosphorylation on Ser⁷²⁷ to achieve maximal transcriptional activity [71,72]. Protein kinases involved in STAT3 serine phosphorylation include protein kinase C (PKC), Jun NH2-terminal kinase, ERK1/2, p38-MAPK, and mammalian target of rapamycin (mTOR) [73]. Interestingly, interaction of STAT3 with the chaperone heat shock protein 90 (Hsp90) contributes to many steps in STAT3 activation [74].

Suppressor of cytokine signaling (SOCS) is a family of target genes that are up-regulated through IL-6-mediated activation of STAT3. These SOCS proteins were originally described as cytokine-induced molecules involved in a

negative feedback loop of cytokine [75] and insulin signaling [76]. Several studies have reported that SOCS3 can inhibit insulin signaling [76-78] by direct interaction with the insulin receptor and by preventing the coupling of insulin receptor substrate (IRS)-1 to the insulin receptor, thereby inhibiting IRS-1 tyrosine phosphorylation and downstream insulin signaling [76,77]. In addition, SOCS3 inhibits insulin signaling by proteasomal-mediated degradation of IRS-1 [78]. Thus, overexpression of SOCS3 in adipocytes inhibits insulin signal transduction [77,79], whereas SOCS3 deficiency in 3T3-L1 adipocytes increases insulin stimulated IRS-1 phosphorylation and glucose uptake [80]. Recently, we have reported that PPARβ/δ activation by GW501516 in adipocytes prevents the IL-6-mediated reduction in insulin-stimulated Akt phosphorylation and glucose uptake, indicating that this drug prevents IL-6-induced insulin resistance [81]. In addition, when we examined the STAT3-SOCS3 pathway we found that PPARβ/δ activation prevented IL-6-mediated induction of SOCS3 mRNA levels and STAT3 phosphorylation in 3T3-L1 adipocytes. Consistent with the role of PPARβ/δ in blocking IL-6-induced STAT3 activity, STAT3-DNA binding activity and STAT3 phosphorylation was higher in white adipose tissue from PPARβ/δ-null mice than in wild-type mice. Our findings also showed that

PPAR β/δ activation elicited STAT3 dissociation from Hsp90 in adipocytes, whereas the association of these two proteins was greatly enhanced in white adipose tissue in PPAR β/δ -null mice compared with wild-type mice. These findings suggest that PPAR β/δ activation can ameliorate insulin resistance in adipose tissue by preventing activation of the STAT3-SOCS3 pathway by cytokines.

Moreover, PPAR β/δ activation in white adipose tissue induces the expression of genes involved in fatty acid oxidation and this contributes to show resistance to obesity [82]. This mechanism can also contribute to the prevention of obesity-induced insulin resistance by reducing the expansion of white adipose tissue and its deleterious effects on insulin sensitivity.

In human white adipose tissue little is known about the functions of PPAR β/δ . In non-obese control subjects PPAR β/δ expression was higher in subcutaneous than in visceral adipose tissue [83]. When compared to non-obese control subjects, obese patients showed reduced PPAR β/δ expression in subcutaneous and visceral adipose tissue, and this expression correlated with insulin levels, suggesting that it may be a suitable therapeutic target for obesity-induced insulin resistance.

In addition, PPAR β/δ is involved in the phenotypic switch of adipose tissue-resident macrophages that modulates insulin sensitivity [84]. Thus, it has been suggested that macrophages infiltrated in adipose tissue from lean animals show an alternatively activated, M2 phenotype [85], that is induced by Th2 cytokines, such as IL-4 and IL-13. These macrophages produce IL-10, a cytokine that inhibits inflammation [86,87]. 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 pro-inflammatory 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 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 [84].

4.2 PPAR β/δ effects in skeletal muscle cells

Since skeletal muscle is a major player in whole-body nutrient balance, it accounts for the majority of insulin-stimulated glucose utilization, and it is therefore the primary site of insulin resistance in obesity and T2DM [88,89].

FFAs may cause insulin resistance in skeletal muscle through several mechanisms, including effects on metabolism [90,91], signaling [88,89] and mitochondrial function [92,93]. In addition, FFAs activate pro-inflammatory pathways, linking the development of this pathology to a chronic low-grade systemic inflammatory response [94]. In addition to saturated 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 they undergo β -oxidation in the mitochondria. In the presence of high plasma FFAs, 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 PKC θ , which is the most abundant PKC isoform in skeletal muscle [95-97]. This PKC isoform inhibits the action of insulin by phosphorylating certain serine residues on IRS-1, including Ser³⁰⁷ in the rodent IRS-1 protein (reviewed in ref. [98]). This phosphorylation impairs insulin-receptor signaling through several distinct mechanisms [99]. PKC θ also impairs insulin sensitivity by activating another serine kinase, I κ B kinase β (IKK β) [100]. In addition to phosphorylating IRS-1 in Ser³⁰⁷, IKK β phosphorylates I κ B. Thus, it activates the pro-inflammatory transcription factor NF- κ B, which has been linked to fatty acid-induced impairment of insulin action in skeletal muscle in rodents [101,102]. Once activated, NF- κ B regulates the expression of multiple inflammatory mediators, including IL-6. This cytokine correlates strongly with insulin resistance and T2DM [64,65,103] and its plasma levels are 2 – 3 times higher in patients with obesity and type 2 diabetes than in lean control subjects [64].

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, by reducing the levels of malonyl-CoA [104]. Interestingly, activation of fatty acid oxidation by overexpressing CPT-1 in cultured skeletal muscle cells [105] and in mouse skeletal muscle [106] 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 [107]). 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 [108]. AMPK is activated by GW501516 by modulating the ATP:AMP ratio [108]. 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. We have recently reported that GW501516 prevented palmitate-induced inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells (Figure 2) [109]. 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. 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 [110,111], this possibility merits further exploration.

In addition, PPAR β/δ also affects the composition in fiber composition, and these changes may affect the development of insulin resistance and T2DM. Thus, it has been reported that muscle-specific overexpression of PPAR β/δ results in a change in fibre composition with a switch to more oxidative fibers [112]. Consistent with this, skeletal muscle-specific knockdown of PPAR β/δ led to a fiber-type switch toward lower oxidative capacity [113]. Interestingly, this fiber-type switch resulted in the development of obesity and type 2 diabetes mellitus [114]. It is worth noting that the changes in fiber composition induced by PPAR β/δ are comparable to those observed in mice undergoing long-term exercise, which are accompanied by increased PPAR β/δ expression in skeletal muscle [112]. Moreover, PPAR β/δ activation by GW0742 also promotes myonuclear accretion [115], which is a typical response to exercise [116]. These findings suggest that exercise and PPAR β/δ activation can activate similar pathways, which can be useful in the fight against the development of insulin resistance and T2DM.

4.3 PPAR β/δ effects in β -cells

Both insulin resistance and impaired insulin secretion contribute to development of T2DM. However, whilst insulin resistance is fully apparent in the pre-diabetic condition, impairment of insulin secretion worsens over time, being paralleled by a progressive decline in both pancreatic β -cell function and β -cell mass [117]. Naturally occurring gut hormones incretins, glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) and glucagon-like peptide-1 (GLP-1), can preserve the morphology and function of pancreatic β -cells. In addition, GIP and GLP-1 stimulate insulin secretion and inhibit glucagon secretion in a glucose-dependent manner. Of note, it has been recently reported that PPAR β/δ

activation regulates enteroendocrine L cell GLP-1 production and enhances its response to glucose and bile acids [118]. GLP-1 production was markedly increased in mice treated with PPAR β/δ agonists, contributing to a significant improvement of glucose homeostasis. Likewise, activation of mouse and human enteroendocrine L cells *in vitro* or *ex vivo* with PPAR β/δ agonists significantly increased glucose and bile acid-induced GLP-1 secretion. The authors of this study suggest that pharmacologic targeting of PPAR β/δ is a promising approach in the treatment of type 2 diabetic patients, especially in combination with dipeptidyl peptidase IV inhibitors. In addition, PPAR β/δ can also amplify insulin secretion in β -cells pre-exposed to high glucose levels [119]. Under these conditions polyunsaturated fatty acids, such as arachidonic and linoleic acid, are released in β -cells and then suffer peroxidation to 4-hydroxy-2E-nonenal, an endogenous ligand for PPAR β/δ , which amplifies insulin secretion in β -cells [119]. Overall, these findings are consistent with a previous study reporting that prolonged treatment of diabetic db/db mice with a PPAR β/δ agonist reduced blood glucose levels in association with improved insulin sensitivity and pancreatic islet function [120].

4.4 PPAR β/δ effects in hepatocytes

Primary nonalcoholic fatty liver disease is one of the most common forms of chronic liver diseases and is considered the hepatic manifestation of insulin-resistant states, such as diabetes and obesity. Sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1), a pivotal transcription factor controlling lipogenesis in hepatocytes, has been implicated in this disease. In fact, aberrant expression and activity of SREBP-1c is associated with obesity and fatty liver [121]. SREBP-1c is bound to the SREBP cleavage-activating protein (SCAP) in the endoplasmic reticulum. In the presence of high sterol levels, the retention of the SA-SREBP complex in the endoplasmic reticulum is mediated by sterol-dependent binding of the complex to one of two endoplasmic reticulum retention proteins, the insulin-induced gene (Insig)-1 and Insig-2 [122]. Under low levels of lipids or sterols in the endoplasmic reticulum, the SA-SREBP complex dissociates from Insig and translocates from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus, where SREBP-1c undergoes proteolysis by the S1P and S2P proteases to generate the active mature transcription factor, which results in the biosynthesis of fatty acids and triglycerides. Qin *et al.* [123] demonstrated that PPAR β/δ prevented the proteolytic processing and activity of SREBP-1, possibly via the induction of Insig-1, and improved hepatic steatosis in obese diabetic db/db mice.

As stated above polarization of macrophages toward the M2 phenotype is PPAR β/δ dependent [84] and this affects the adipose tissue and liver. Thus, PPAR β/δ mice carrying a PPAR β/δ deletion in macrophages showed marked fatty liver, with increased lipogenesis and decreased oxidative metabolism [84], suggesting that macrophage PPAR β/δ also plays a role in fatty liver disease.

Dyslipidemia is a powerful predictor of cardiovascular disease in patients at high risk [124-127], such as type 2 diabetic patients. Lowering of low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) is the prime target for treatment [128], but even with intensification of statin therapy, a substantial residual cardiovascular risk remains [129]. This may partly be due to atherogenic dyslipidemia. This term is commonly used to describe a condition of abnormally elevated plasma triglycerides and low high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), irrespective of the levels of LDL-C [130]. In addition to these key components, increased levels of small, dense LDL-C particles are also present, which in conjunction with the former components conform the also called "lipid triad" [131]. It is now recognized that atherogenic dyslipidemia is mainly initiated by the hepatic overproduction of the plasma lipoproteins carrying triglycerides, the VLDL, which induce a sequence of lipoprotein changes leading to atherogenic lipid abnormalities in T2DM and the metabolic syndrome [132]. Under these pathological conditions, the presence of insulin resistance at the level of adipose tissue leads to enhanced lipolysis and reduced FFA uptake and esterification. This results in increased flux into the liver of FFAs, which are either oxidized or esterified for triglyceride production, leading to hepatic steatosis and oversecretion into plasma of larger triglyceride-rich VLDL particles [133]. These particles compete with chylomicrons and their remnants for clearance pathways regulated by lipoprotein lipase, an endothelial-bound enzyme, and by hepatic receptors, thereby exacerbating postprandial dyslipidemia. In addition, insulin resistance increases hepatic secretion of apoC-III, which is attached to VLDL, delaying the catabolism of triglyceride-rich lipoproteins by inhibiting lipoprotein lipase and binding of remnant triglyceride-rich lipoproteins to hepatic clearance receptors [132]. Finally, expansion of the VLDL triglyceride pool leads to cholesterol depletion and triglyceride enrichment of LDL and HDL through cholesteryl ester transfer protein. This, in turn, facilitates the movement of cholesterol esters to VLDL, intermediate-density lipoprotein (IDL) and LDL from cholesterol ester rich HDL, leading to the accumulation in plasma of small, dense LDLs and a reduction in HDLs [133].

In mice, deletion of PPAR β/δ led to enhanced LDL and triglyceride levels [134]. It has been proposed that the increase in triglycerides observed in these PPAR β/δ -null mice is caused by a combination of increased VLDL production and decreased plasma triglyceride clearance, as demonstrated by a decrease in post-heparin LPL activity and increased hepatic expression of the LPL inhibitors angiopoietin-like protein 3 and 4 [134]. Recent findings in our laboratory indicate that additional mechanisms can also contribute to the hypotriglyceridemic effect of PPAR β/δ [135]. Interestingly, the main factor influencing hepatic triglyceride secretion is fatty acid availability [136]. 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 was unknown whether the hypotriglyceridemic effect observed following PPAR β/δ activation involved increased hepatic fatty acid oxidation, and if so, which mechanisms were responsible. The rate-limiting step for mitochondrial β -oxidation is the transport of fatty acid into mitochondria by liver CPT1a. This fatty acid transporter is under the control of both PPARs and AMPK, which detects low ATP levels and, in turn, increases oxidative metabolism by reducing the levels of malonyl-CoA [137]. 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 [108]. It is worth noting that a recently discovered protein, lipin 1, plays an important role in hepatic fatty acid oxidation, since it determines whether fatty acids are incorporated into triglycerides or undergo mitochondrial β -oxidation. In addition, the expression and compartmentalization of lipin 1 controls the secretion of hepatic triglycerides [138]. 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 [139]. 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 medium chain acyl-CoA dehydrogenase (*Mcad*) [140].

When we examined the effects of a high-fat diet on hypertriglyceridemia and on the hepatic fatty acid oxidation pathway, we observed that exposure to high-fat diet caused hypertriglyceridemia accompanied by reduced hepatic mRNA levels of *PGC-1 α* and *lipin 1*, reduced hepatic phospho-AMPK levels and increased activity of ERK1/2 [135]. Interestingly, GW501516 treatment reduced hypertriglyceridemia, and restored hepatic phosphorylated levels of AMPK and ERK1/2. GW501516 increased nuclear lipin 1 protein levels, leading to amplification of the PGC-1 α -PPAR α signaling system. This was 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, such as *CPT-1a* and *Mcad*. 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-phosphatidylcholine [141], 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 the high-fat diet. In addition, our data indicated that the activation of AMPK after GW501516 treatment in mice fed a high-fat diet might be the result of an increase in the AMP-to-ATP ratio in hepatocytes [135]. Overall, these

findings suggest that the hypotriglyceridemic effect of GW501516 in high-fat diet-fed mice is accompanied by an increase in phospho-AMPK levels and the amplification of the PGC-1 α -lipin 1-PPAR α pathway.

Since the PPAR β/δ activator GW501516 increased circulating HDL-C levels and decreased triglyceride and insulin levels [140], attenuated metabolic syndrome [142], prevented obesity [143], and improved insulin sensitivity [144], this drug reached clinical trials for dyslipidemia. In a first study, GW501516 increased HDL-C levels in healthy volunteers [111]. However, in overweight volunteers, treatment did not affect HDL-C levels, but it decreased plasma triglycerides, apoB, LDL-cholesterol and insulin [110]. In dyslipidemic men with central obesity, a recent randomized, double-blind, crossover trial of 6 weeks intervention periods with placebo or GW501516 (2.5 mg/d), with 2-wk placebo washout between treatment periods, demonstrated that GW501516 increased the hepatic removal of VLDL particles, which might have resulted from decreased apoC-III concentration. These studies support the potential use of PPAR β/δ ligands in treating dyslipidemia in obesity [145].

PPAR β/δ activation not only affects lipid metabolism and lipoprotein metabolism in liver cells, but also interferes with IL-6-mediated acute phase reaction [146] and insulin resistance in hepatocytes (Serrano-Marco *et al.*, 2012 in press). In both studies, PPAR β/δ agonists inhibited the transcriptional activity of STAT3. As stated above, the IL-6-STAT3-SOCS3 pathway plays an important role in insulin resistance and we have recently reported that the PPAR β/δ agonist GW501516 prevented IL-6-mediated induction of *SOCS3* mRNA levels and STAT3 phosphorylation on Tyr⁷⁰⁵ and Ser⁷²⁷ in HepG2 cells. Consistent with the role of PPAR β/δ in blocking IL-6-induced STAT3 activity, STAT3 phosphorylation on Tyr⁷⁰⁵ and Ser⁷²⁷ was higher in liver from PPAR β/δ -null mice than in wild-type mice. Consistent with the inhibition of the STAT3-SOCS3 pathway caused by GW501516, this drug prevented the reduction in insulin-stimulated Akt phosphorylation and in IRS-1 and IRS-2 protein levels. GW501516 prevented the increase in ERK-1/2 phosphorylation caused by IL-6 exposure, suggesting that this mechanism contributes to its effects on STAT3 phosphorylation on Ser⁷²⁷, as previously reported in adipocytes [81]. Our findings also showed that GW501516 prevented the reduction in phospho-AMPK levels observed in IL-6-exposed cells by increasing the AMP/ATP ratio. This mechanism can explain the reduction in STAT3 phosphorylation on Tyr⁷⁰⁵ observed following GW501516 treatment. Additional studies are required to explore whether this mechanism also operates *in vivo*.

5. Conclusion

Since the discovery of the first selective PPAR β/δ agonist, a large number of pre-clinical studies showed us the pharmacologic effects of these compounds in several pathophysiological models, indicating that such drugs have a

promising future in the treatment of several diseases. As a result of this potential interest of the PPAR β/δ activators, these compounds have reached clinical trials. However, the number of clinical trials performed to study the efficacy and safety of PPAR β/δ ligands in humans is still scarce. Therefore, although a therapeutic use of PPAR β/δ agonists in the future seems likely, this will be achieved only after testing their efficacy and safety in humans in clinical trials.

6. Expert opinion

The treatment and prevention of obesity, insulin resistance and T2DM requires lifestyle changes, including weight reduction, increased physical activity and a healthy 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. In skeletal muscle, PPAR β/δ ligands may also up-regulate 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 and by preventing IL-6-induced insulin resistance. In hepatocytes, PPAR β/δ agonists prevent IL-6-mediated acute phase reaction and insulin resistance. Finally, in β -cells PPAR β/δ activators potentiate GLP-1 production by the small intestine, an effect that may be useful for the treatment of T2DM. In addition, PPAR β/δ activation in the heart prevents cardiac hypertrophy [147], lipid-induced inflammation [148] and improves cardiomyopathy [149].

Despite the abundance of preclinical data supporting the notion that the treatment with PPAR β/δ ligands prevents insulin resistance and T2DM, there is a gap between these preclinical data and the clinical trials. Therefore, as with any drug designed for human therapy, a great deal of research on the efficacy and safety of PPAR β/δ activators will be needed before they can be considered appropriate for clinical use. For instance, the ability of PPAR β/δ activators to raise HDL-C 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 might depend on their effects on thermogenesis, which is a minor mechanism of energy expenditure in humans and primates.

Regarding safety issues we should bear in mind that the management of a condition like T2DM will probably require the long-term dosing of the therapeutic agent. At present the side effects of PPAR β/δ ligands in long-term clinical trials (> 6 months) are unknown. Safety issues have also been raised regarding the connection between PPAR β/δ ligands and carcinogenesis, particularly in animal models [150-156]. This concern is important considering that the PPAR γ ligands thiazolidinediones are associated with bladder cancer in

humans [157]. However, synthetic PPAR α ligands induce carcinogenesis in rodents, but not in humans [158,159].

In summary, while several concerns remain for the development of PPAR β/δ agonists, these drugs have demonstrated their efficacy in the treatment of insulin resistance and T2DM in preclinical studies and in a few short clinical studies in humans. Although these data are promising, additional studies must be performed to confirm the efficacy and the safety of these drugs in the treatment of T2DM.

Acknowledgements

The author's work that is summarized in this review was supported by grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain (SAF2009-06939). CIBER de Diabetes y

Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM) is an Instituto de Salud Carlos III project. Laia Salvadó and Lucía Serrano-Marco 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 helpful assistance.

Declaration of interest

The author's work, that is summarized in this review, was supported by grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain (SAF2009-06939). CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM) is an Instituto de Salud Carlos III project. Laia Salvadó and Lucía Serrano-Marco were supported by grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain.

Bibliography

Papers of special note have been highlighted as either of interest (●) or of considerable interest (●●) to readers.

- Laudet V, Auwerx J, Gustafsson J-A, Wahli W. A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell* 1999;97:161-3
- de DC, Beaufay H, Jacques P, et al. Intracellular localization of catalase and of some oxidases in rat liver. *Biochim Biophys Acta* 1960;40:186-7
- Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 1990;347:645-50
- Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 1999;20:649-88
- **Exhaustive review about the role of PPARs in metabolism.**
- Moraes LA, Piqueras L, Bishop-Bailey D. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. *Pharmacol Ther* 2006;110:371-85
- Zamir I, Zhang J, Lazar MA. Stoichiometric and steric principles governing repression by nuclear hormone receptors. *Genes Dev* 1997;11:835-46
- Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm Res* 2000;49:497-505
- Feige JN, Gelman L, Michalik L, et al. From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. *Prog Lipid Res* 2006;45:120-59
- Wadosky KM, Willis MS. The story so far: post-translational regulation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) by ubiquitination and SUMOylation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; in press
- Pascual G, Fong AL, Ogawa S, et al. A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. *Nature* 2005;437:759-63
- Daynes RA, Jones DC. Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 2002;2:748-59
- Kamei Y, Xu L, Heinzl T, et al. A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* 1996;85:403-14
- Li M, Pascual G, Glass CK. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene. *Mol Cell Biol* 2000;20:4699-707
- Delerive P, De BK, Besnard S, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J Biol Chem* 1999;274:32048-54
- Delerive P, Martin-Nizard F, Chinetti G, 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. *Circ Res* 1999;85:394-402
- Desreumaux P, Dubuquoy L, Nutten S, et al. Attenuation of colon inflammation through activators of the retinoid X receptor (RXR)/peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) heterodimer. A basis for new therapeutic strategies. *J Exp Med* 2001;193:827-38
- Johnson TE, Holloway MK, Vogel R, et al. Structural requirements and cell-type specificity for ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1997;63:1-8
- Devchand PR, Keller H, Peters JM, et al. The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature* 1996;384:39-43
- **Key study demonstrating a role for PPAR α in inflammation.**
- Narala VR, Adapala RK, Suresh MV, et al. Leukotriene B4 is a physiologically relevant endogenous peroxisome proliferator-activated receptor-alpha agonist. *J Biol Chem* 2010;285:22067-74
- 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
- Keller H, Dreyer C, Medin J, et al. Fatty acids and retinoids control lipid

- metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:2160-4
22. Gulick T, Cresci S, Caira T, et al. The peroxisome proliferator-activated receptor regulates mitochondrial fatty acid oxidative enzyme gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:11012-16
 23. Gervois P, Torra IP, Fruchart JC, Staels B. Regulation of lipid and lipoprotein metabolism by PPAR activators. *Clin Chem Lab Med* 2000;38:3-11
 24. Vu-Dac N, Gervois P, Jakel H, et al. Apolipoprotein A5, a crucial determinant of plasma triglyceride levels, is highly responsive to peroxisome proliferator-activated receptor alpha activators. *J Biol Chem* 2003;278:17982-5
 25. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 1994;79:1147-56
 26. Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, et al. PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell* 1999;4:611-17
 27. Kubota N, Terauchi Y, Miki H, et al. PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell* 1999;4:597-609
 28. He W, Barak Y, Hevener A, et al. Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor gamma knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:15712-17
 29. Dreyer C, Krey G, Keller H, et al. Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell* 1992;68:879-87
 30. Schmidt A, Endo N, Rutledge SJ, et al. Identification of a new member of the steroid hormone receptor superfamily that is activated by a peroxisome proliferator and fatty acids. *Mol Endocrinol* 1992;6:1634-41
 31. Kliewer SA, Forman BM, Blumberg B, et al. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:7355-9
 32. Amri EZ, Bonino F, Ailhaud G, et al. Cloning of a protein that mediates transcriptional effects of fatty acids in preadipocytes. Homology to peroxisome proliferator-activated receptors. *J Biol Chem* 1995;270:2367-71
 33. Escher P, Braissant O, Basu-Modak S, et al. Rat PPARs: quantitative analysis in adult rat tissues and regulation in fasting and refeeding. *Endocrinology* 2001;142:4195-202
 34. Girroir EE, Hollingshead HE, He P, et al. Quantitative expression patterns of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta (PPARbeta/delta) protein in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;371:456-61
 35. Takada I, Yu RT, Xu HE, et al. Alteration of a single amino acid in peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR alpha) generates a PPAR delta phenotype. *Mol Endocrinol* 2000;14:733-40
 36. Xu HE, Lambert MH, Montana VG, et al. Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. *Mol Cell* 1999;3:397-403
 37. Forman BM, Ruan B, Chen J, et al. The orphan nuclear receptor LXRalpha is positively and negatively regulated by distinct products of mevalonate metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:10588-93
 38. Yu K, Bayona W, Kallen CB, et al. Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptors by eicosanoids. *J Biol Chem* 1995;270:23975-83
 39. Krey G, Braissant O, L'Horset F, et al. Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol Endocrinol* 1997;11:779-91
 40. Chawla A, Lee CH, Barak Y, et al. PPARdelta is a very low-density lipoprotein sensor in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:1268-73
 41. Shaw N, Elholm M, Noy N. Retinoic acid is a high affinity selective ligand for the peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta. *J Biol Chem* 2003;278:41589-92
 42. Rieck M, Meissner W, Ries S, et al. Ligand-mediated regulation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) beta/delta: a comparative analysis of PPAR-selective agonists and all-trans retinoic acid. *Mol Pharmacol* 2008;74:1269-77
 43. Borland MG, Foreman JE, Girroir EE, et al. Ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta inhibits cell proliferation in human HaCaT keratinocytes. *Mol Pharmacol* 2008;74:1429-42
 44. Berger J, Leibowitz MD, Doebber TW, et al. Novel peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma and PPARdelta ligands produce distinct biological effects. *J Biol Chem* 1999;274:6718-25
 45. Sznajdman ML, Haffner CD, Maloney PR, et al. Novel selective small molecule agonists for peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARdelta)-synthesis and biological activity. *Bioorg Med Chem Lett* 2003;13:1517-21
 46. Shearer BG, Steger DJ, Way JM, et al. Identification and characterization of a selective peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (NR1C2) antagonist. *Mol Endocrinol* 2008;22:523-9
 47. Surampudi PN, John-Kalarickal J, Fonseca VA. Emerging concepts in the pathophysiology of type 2 diabetes mellitus. *Mt Sinai J Med* 2009;76:216-26
 48. Tripathy D, Chavez AO. Defects in insulin secretion and action in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Curr Diab Rep* 2010;10:184-91
 49. Nalysnyk L, Hernandez-Medina M, Krishnarajah G. Glycaemic variability and complications in patients with diabetes mellitus: evidence from a systematic review of the literature. *Diabetes Obes Metab* 2010;12:288-98
 50. Grundy SM. Metabolic syndrome pandemic. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:629-36
 51. Mathieu P, Lemieux I, Despres JP. Obesity, inflammation, and cardiovascular risk. *Clin Pharmacol Ther* 2010;87:407-16
 52. Mathieu P, Pibarot P, Despres JP. Metabolic syndrome: the danger signal in

Targeting PPAR β/δ for the treatment of type 2 diabetes mellitus

- atherosclerosis. *Vasc Health Risk Manag* 2006;2:285-302
53. Boden G, Jadali F, White J, et al. Effects of fat on insulin-stimulated carbohydrate metabolism in normal men. *J Clin Invest* 1991;88:960-6
54. Boden G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* 1997;46:3-10
55. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, et al. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 2006;116:3015-25
56. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006;124:783-801
57. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 2006;116:1793-801
58. Nguyen MT, Faveyukis S, Nguyen AK, 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. *J Biol Chem* 2007;282:35279-92
59. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007;56:1761-72
60. Rodriguez-Calvo R, Serrano L, Coll T, 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
61. Chung S, Lapoint K, Martinez K, et al. Preadipocytes mediate lipopolysaccharide-induced inflammation and insulin resistance in primary cultures of newly differentiated human adipocytes. *Endocrinology* 2006;147:5340-51
62. Barbarroja N, Lopez-Pedraza R, Mayas MD, et al. The obese healthy paradox: is inflammation the answer? *Biochem J* 2010;430:141-9
63. Vojarova B, Weyer C, Hanson K, et al. Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion. *Obes Res* 2001;9:414-17
64. Kern PA, Ranganathan S, Li C, et al. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;280:E745-51
65. Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, et al. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 2001;286:327-34
66. Klover PJ, Clementi AH, Mooney RA. Interleukin-6 depletion selectively improves hepatic insulin action in obesity. *Endocrinology* 2005;146:3417-27
67. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, et al. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 2003;374:1-20
68. Kamimura D, Ishihara K, Hirano T. IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2003;149:1-38
69. Ernst M, Jenkins BJ. Acquiring signalling specificity from the cytokine receptor gp130. *Trends Genet* 2004;20:23-32
70. Bromberg J, Darnell JE Jr. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* 2000;19:2468-73
71. Wen Z, Zhong Z, Darnell JE Jr. Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* 1995;82:241-50
72. Zhang X, Blenis J, Li HC, et al. Requirement of serine phosphorylation for formation of STAT-promoter complexes. *Science* 1995;267:1990-4
73. Decker T, Kovarik P. Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene* 2000;19:2628-37
74. He HJ, Zhu TN, Xie Y, et al. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits interleukin-6 signaling through impaired STAT3 activation and association with transcriptional coactivators in hepatocytes. *J Biol Chem* 2006;281:31369-79
75. Starr R, Willson TA, Viney EM, et al. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 1997;387:917-21
76. Emanuelli B, Peraldi P, Filloux C, et al. SOCS-3 inhibits insulin signaling and is up-regulated in response to tumor necrosis factor-alpha in the adipose tissue of obese mice. *J Biol Chem* 2001;276:47944-9
77. Emanuelli B, Peraldi P, Filloux C, et al. SOCS-3 is an insulin-induced negative regulator of insulin signaling. *J Biol Chem* 2000;275:15985-91
78. Rui L, Yuan M, Frantz D, et al. SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. *J Biol Chem* 2002;277:42394-8
79. Lagathu C, Bastard JP, Auclair M, et al. Chronic interleukin-6 (IL-6) treatment increased IL-6 secretion and induced insulin resistance in adipocyte: prevention by rosiglitazone. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;311:372-9
80. Shi H, Tzameli I, Bjorbaek C, Flier JS. Suppressor of cytokine signaling 3 is a physiological regulator of adipocyte insulin signaling. *J Biol Chem* 2004;279:34733-40
81. Serrano-Marco L, Rodriguez-Calvo R, El Kochairi I, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta (PPAR-beta/delta) ameliorates insulin signaling and reduces SOCS3 levels by inhibiting STAT3 in Interleukin-6-stimulated adipocytes. *Diabetes* 2011;60:1990-9
82. Peters JM, Lee SS, Li W, et al. Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor beta(delta). *Mol Cell Biol* 2000;20:5119-28
83. Bortolotto JW, Margis R, Ferreira AC, et al. Adipose tissue distribution and quantification of PPARbeta/delta and PPARgamma1-3 mRNAs: discordant gene expression in subcutaneous, retroperitoneal and visceral adipose tissue of morbidly obese patients. *Obes Surg* 2007;17:934-40
84. Kang K, Reilly SM, Karabacak V, et al. Adipocyte-derived Th2 cytokines and myeloid PPARdelta regulate macrophage polarization and insulin sensitivity. *Cell Metab* 2008;7:485-95
- **Key study reporting that polarization of macrophages toward the M2 phenotype is PPAR β/δ dependent and this affects the adipose tissue and liver.**
85. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 2003;3:23-35
86. Roden M, Perseghin G, Petersen KF, et al. The roles of insulin and glucagon in the regulation of hepatic glycogen

- synthesis and turnover in humans. *J Clin Invest* 1996;97:642-8
87. Haber EP, Hirabara SM, Gomes AD, et al. Palmitate modulates the early steps of insulin signalling pathway in pancreatic islets. *FEBS Lett* 2003;544:185-8
 88. Silveira LR, Fiamoncini J, Hirabara SM, et al. Updating the effects of fatty acids on skeletal muscle. *J Cell Physiol* 2008;217:1-12
 89. Hirabara SM, Silveira LR, Abdulkader F, et al. Time-dependent effects of fatty acids on skeletal muscle metabolism. *J Cell Physiol* 2007;210:7-15
 90. Roden M, Price TB, Perseghin G, et al. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest* 1996;97:2859-65
 91. Haber EP, Hirabara SM, Gomes AD, et al. Palmitate modulates the early steps of insulin signalling pathway in pancreatic islets. *FEBS Lett* 2003;544:185-8
 92. Schrauwen P, Schrauwen-Hinderling V, Hoeks J, Hesselink MK. Mitochondrial dysfunction and lipotoxicity. *Biochim Biophys Acta* 2010;1801:266-71
 93. Hirabara SM, Curi R, Maechler P. Saturated fatty acid-induced insulin resistance is associated with mitochondrial dysfunction in skeletal muscle cells. *J Cell Physiol* 2010;222:187-94
 94. Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 2005;115:1111-19
 95. Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, et al. Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes* 1999;48:1270-4
 96. Cortright RN, Azevedo JL, Zhou Q, et al. Protein kinase C modulates insulin action in human skeletal muscle. *Am J Physiol-Endocrinol Metab* 2000;278:E553-62
 97. Itani SI, Zhou Q, Pories WJ, et al. Involvement of protein kinase C in human skeletal muscle insulin resistance and obesity. *Diabetes* 2000;49:1353-8
 98. Gual P, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF. Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie* 2005;87:99-109
 99. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, et al. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science* 1996;271:665-8
 100. Perseghin G, Petersen K, Shulman GI. Cellular mechanism of insulin resistance: potential links with inflammation. *Int J Obes* 2003;27:S6-S11
 101. Kim JK, Kim YJ, Fillmore JJ, et al. Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate. *J Clin Invest* 2001;108:437-46
 102. Yuan MS, Konstantopoulos N, Lee JS, et al. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of IKK beta. *Science* 2001;293:1673-7
 103. Pickup JC, Mattock MB, Chusney GD, Burt D. NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. *Diabetologia* 1997;40:1286-92
 104. Reznick RM, Shulman GI. The role of AMP-activated protein kinase in mitochondrial biogenesis. *J Physiol* 2006;574:33-9
 105. Sebastian D, Herrero L, Serra D, et al. CPT I overexpression protects L6E9 muscle cells from fatty acid-induced insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;292:E677-86
 106. Bruce CR, Hoy AJ, Turner N, 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* 2009;58:550-8
 107. Barish GD, Narkar VA, Evans RM. PPAR delta: a dagger in the heart of the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2006;116:590-7
 108. Kramer DK, Al-Khalili L, Guigas B, et al. 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
 109. Coll T, Varez-Guardia D, Barroso E, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- $\{\delta\}$ by GW501516 prevents fatty acid-induced nuclear factor- $\{\kappa\}$ B activation and insulin resistance in skeletal muscle cells. *Endocrinology* 2010;151:1560-9
 110. Riserus U, Sprecher D, Johnson T, et al. 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* 2008;57:332-9
 - **A key clinical study demonstrating multiple actions of GW501516.**
 111. Sprecher DL, Massien C, Pearce G, et al. Triglyceride:high-density lipoprotein cholesterol effects in healthy subjects administered a peroxisome proliferator activated receptor delta agonist. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:359-65
 112. Luquet S, Lopez-Soriano J, Holst D, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor delta controls muscle development and oxidative capability. *FASEB J* 2003;17:2299-301
 113. Schuler M, Ali F, Chambon C, et al. PGC1alpha expression is controlled in skeletal muscles by PPARbeta, whose ablation results in fiber-type switching, obesity, and type 2 diabetes. *Cell Metab* 2006;4:407-14
 114. Higashiura K, Ura N, Takada T, et al. Alteration of muscle fiber composition linking to insulin resistance and hypertension in fructose-fed rats. *Am J Hypertens* 1999;12:596-602
 115. Giordano C, Rousseau AS, Wagner N, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor beta activation promotes myonuclear accretion in skeletal muscle of adult and aged mice. *Pflugers Arch* 2009;458:901-13
 116. Li P, Akimoto T, Zhang M, et al. Resident stem cells are not required for exercise-induced fiber-type switching and angiogenesis but are necessary for activity-dependent muscle growth. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;290:C1461-8
 117. Del PS. Role of glucotoxicity and lipotoxicity in the pathophysiology of Type 2 diabetes mellitus and emerging treatment strategies. *Diabet Med* 2009;26:1185-92
 118. Daoudi M, Hennuyer N, Borland MG, et al. PPARbeta/delta activation induces enteroendocrine L cell GLP-1 production. *Gastroenterology* 2011;140:1564-74
 119. Cohen G, Riahi Y, Shamni O, et al. Role of lipid peroxidation and PPAR- $\{\delta\}$ in amplifying glucose-stimulated

- insulin secretion. *Diabetes* 2011;60:2830-42
120. Winzell MS, Wulff EM, Olsen GS, et al. Improved insulin sensitivity and islet function after PPAR δ activation in diabetic db/db mice. *Eur J Pharmacol* 2010;626:297-305
 121. Shimomura I, Bashmakov Y, Horton JD. Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus. *J Biol Chem* 1999;274:30028-32
 122. Yang T, Espenshade PJ, Wright ME, et al. Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell* 2002;110:489-500
 123. Qin X, Xie X, Fan Y, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-delta induces insulin-induced gene-1 and suppresses hepatic lipogenesis in obese diabetic mice. *Hepatology* 2008;48:432-41
 124. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 2002;106:3143-421
 125. Barter P, Gotto AM, LaRosa JC, et al. HDL cholesterol, very low levels of LDL cholesterol, and cardiovascular events. *N Engl J Med* 2007;357:1301-10
 126. Miller M, Cannon CP, Murphy SA, et al. Impact of triglyceride levels beyond low-density lipoprotein cholesterol after acute coronary syndrome in the PROVE IT-TIMI 22 trial. *J Am Coll Cardiol* 2008;51:724-30
 127. Fruchart JC, Sacks FM, Hermans MP, et al. The Residual Risk Reduction Initiative: a call to action to reduce residual vascular risk in dyslipidaemic patient. *Diab Vasc Dis Res* 2008;5:319-35
 128. Shepherd J, Barter P, Carmena R, et al. Effect of lowering LDL cholesterol substantially below currently recommended levels in patients with coronary heart disease and diabetes: the Treating to New Targets (TNT) study. *Diabetes Care* 2006;29:1220-6
 129. Grundy SM. Atherogenic dyslipidemia: lipoprotein abnormalities and implications for therapy. *Am J Cardiol* 1995;75:45B-52B
 130. Shepherd J, Betteridge J, Van GL. Nicotinic acid in the management of dyslipidaemia associated with diabetes and metabolic syndrome: a position paper developed by a European Consensus Panel. *Curr Med Res Opin* 2005;21:665-82
 131. Adiels M, Olofsson SO, Taskinen MR, Boren J. Overproduction of very low-density lipoproteins is the hallmark of the dyslipidemia in the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:1225-36
 132. Chan DC, Watts GF. Dyslipidaemia in the metabolic syndrome and type 2 diabetes: pathogenesis, priorities, pharmacotherapies. *Expert Opin Pharmacother* 2011;12:13-30
 133. Taskinen MR. Diabetic dyslipidaemia: from basic research to clinical practice. *Diabetologia* 2003;46:733-49
 134. Akiyama TE, Lambert G, Nicol CJ, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta regulates very low density lipoprotein production and catabolism in mice on a Western diet. *J Biol Chem* 2004;279:20874-81
 135. Barroso E, Rodriguez-Calvo R, Serrano-Marco L, et al. The PPAR{beta}/ {delta} activator GW501516 prevents the down-regulation of AMPK caused by a high-fat diet in liver and amplifies the PGC-1{alpha}-Lipin 1-PPAR{alpha} pathway leading to increased fatty acid oxidation. *Endocrinology* 2011;152:1848-59
 136. Lewis GF. Fatty acid regulation of very low density lipoprotein production. *Curr Opin Lipidol* 1997;8:146-53
 137. Zhang BB, Zhou G, Li C. AMPK: an emerging drug target for diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metab* 2009;9:407-16
 138. Bou KM, Sundaram M, Zhang HY, et al. The level and compartmentalization of phosphatidate phosphatase-1 (lipin-1) control the assembly and secretion of hepatic VLDL. *J Lipid Res* 2009;50:47-58
 139. Finck BN, Gropler MC, Chen Z, et al. Lipin 1 is an inducible amplifier of the hepatic PGC-1alpha/PPARalpha regulatory pathway. *Cell Metab* 2006;4:199-210
 140. Oliver WR Jr, Shenk JL, Snaith MR, et al. A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:5306-11
 141. Chakravarthy MV, Lodhi IJ, Yin L, et al. Identification of a physiologically relevant endogenous ligand for PPARalpha in liver. *Cell* 2009;138:476-88
 142. Tanaka T, Yamamoto J, Iwasaki S, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:15924-9
 - **A comprehensive study of the actions of GW501516 in mouse models of Type 2 diabetes mellitus and obesity.**
 143. Wang YX, Lee CH, Tiep S, et al. Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell* 2003;113:159-70
 144. Lee CH, Olson P, Hevener A, et al. PPARdelta regulates glucose metabolism and insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:3444-9
 145. Ooi EM, Watts GF, Sprecher DL, et al. Mechanism of action of a peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-delta agonist on lipoprotein metabolism in dyslipidemic subjects with central obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:E1568-76
 146. Kino T, Rice KC, Chrousos GP. The PPARdelta agonist GW501516 suppresses interleukin-6-mediated hepatocyte acute phase reaction via STAT3 inhibition. *Eur J Clin Invest* 2007;37:425-33
 147. Planavila A, Rodriguez-Calvo R, Jove M, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta activation inhibits hypertrophy in neonatal rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 2005;65:832-41
 148. varez-Guardia D, Palomer X, Coll T, et al. PPARbeta/delta activation blocks lipid-induced inflammatory pathways in mouse heart and human cardiac cells. *Biochim Biophys Acta* 2011;1811:59-67
 149. Cheng L, Ding G, Qin Q, et al. Cardiomyocyte-restricted peroxisome proliferator-activated receptor-delta deletion perturbs myocardial fatty acid oxidation and leads to cardiomyopathy. *Nat Med* 2004;10:1245-50

150. Reed KR, Sansom OJ, Hayes AJ, et al. PPARdelta status and Apc-mediated tumorigenesis in the mouse intestine. *Oncogene* 2004;23:8992-6
151. Harman FS, Nicol CJ, Marin HE, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-delta attenuates colon carcinogenesis. *Nat Med* 2004;10:481-3
152. Gupta S, Purcell NH, Lin AN, Sen S. Activation of nuclear factor-kappa B is necessary for myotrophin-induced cardiac hypertrophy. *J Cell Biol* 2002;159:1019-28
153. Park BH, Vogelstein B, Kinzler KW. Genetic disruption of PPARdelta decreases the tumorigenicity of human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:2598-603
154. Peters JM, Hollingshead HE, Gonzalez FJ. Role of peroxisome-proliferator-activated receptor beta/delta (PPARbeta/delta) in gastrointestinal tract function and disease. *Clin Sci (Lond)* 2008;115:107-27
155. Peters JM, Gonzalez FJ. Sorting out the functional role(s) of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta (PPARbeta/delta) in cell proliferation and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2009;1796:230-41
156. Peters JM, Foreman JE, Gonzalez FJ. Dissecting the role of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta (PPARbeta/delta) in colon, breast, and lung carcinogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 2011;30:619-40
- **An up-to-date review on the safety issues of PPARβ/δ.**
157. Piccinni C, Motola D, Marchesini G, Poluzzi E. Assessing the association of pioglitazone use and bladder cancer through drug adverse event reporting. *Diabetes Care* 2011;34:1369-71
- **A recent study reporting the effects of pioglitazone on bladder cancer.**
158. Klaunig JE, Babich MA, Baetcke KP, et al. PPARalpha agonist-induced rodent tumors: modes of action and human relevance. *Crit Rev Toxicol* 2003;33:655-780
159. Peters JM, Cheung C, Gonzalez FJ. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and liver cancer: where do we stand? *J Mol Med (Berl)* 2005;83:774-85

Affiliation

Laia Salvadó, Lucía Serrano-Marco, Emma Barroso, Xavier Palomer & Manuel Vázquez-Carrera[†]
[†]Author for correspondence
 University of Barcelona,
 Department of Pharmacology and Therapeutic Chemistry, CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM)-Instituto de Salud Carlos III and IBUB (Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona), Faculty of Pharmacy, Diagonal 643, E-08028 Barcelona, Spain
 Tel: +34 93 4024531; Fax: +34 93 4035982; E-mail: mvazquezcarrera@ub.edu

