

UNIVERSIDAD CEU-SAN PABLO
FACULTAD DE FARMACIA
Dpto. de CIENCIAS FARMACEUTICAS Y DE LA ALIMENTACIÓN



TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE LAS ADAPTACIONES Y ALTERACIONES
METABÓLICAS CARDIACAS EN UN MODELO DE OBESIDAD
INDUCIDA POR DIETA EN RATÓN**

Rocío Guzmán Ruiz

Madrid, 2010

UNIVERSIDAD CEU-SAN PABLO
FACULTAD DE FARMACIA
Dpto. de CIENCIAS FARMACEUTICAS Y DE LA ALIMENTACIÓN



TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE LAS ADAPTACIONES Y ALTERACIONES
METABÓLICAS CARDIACAS EN UN MODELO DE OBESIDAD
INDUCIDA POR DIETA EN RATÓN**

Memoria que presenta

Rocío Guzmán Ruiz

Para optar al grado de DOCTOR por la Universidad CEU-San Pablo.

Directores:

Mariano Ruiz Gayo,

Beatriz Somoza Hernández, Marisol Fernández Alfonso

Madrid, 2010

*A Jose Ignacio,
a mi familia,
y a todos los que la habéis hecho posible.*

La realización de una tesis es un periodo fascinante lleno de sorpresas, de alegrías y penas, de risas y llantos. Es un periodo en el que aprendes no solo el manejo de aparatos y protocolos de trabajo, sino que aprendes a pensar, a razonar el por qué de los resultados, y a cómo darle la importancia y relevancia que merece la investigación. Convives con gente muy distinta a ti y sin embargo, aprendes a depender de ella y a la vez, a ser independiente; maduras, creces como persona y como profesional, y lo único que esperas, una vez que acabas es tener la oportunidad de demostrar que vales para investigar, que puedes hacer cosas importantes y que elegir realizar una tesis merece la pena, al igual que a ti te lo han demostrado tanto "jefes", como amigos y compañeros. Por eso cuando escribes los agradecimientos y comienzas a pensar en cuantas personas han formado parte de esta tesis, te das cuenta que unas cuantas palabras escritas en unas hojas no hacen justicia a todos los agradecimientos que te gustaría hacer por separado a cada una de ellas.

En primer lugar quisiera agradecer a la Fundación CEU-San Pablo la concesión de la beca que me ha permitido realizar este trabajo. Igualmente quisiera agradecer a todas aquellas personas que han contribuido a facilitarme dicho trabajo. Desde los directores, que organizan y dirigen los experimentos, hasta los pobres animalillos que sacrifican su vida para llevarlos a cabo, pasando por Chema y el magnifico personal del animalario, ¡gracias chicos por cuidar a los animales en esos periodos tan "críticos" de trabajo como son navidad, semana santa y verano! También quiero agradecer al departamento de bioquímica su colaboración y ayuda prestada en este trabajo. Gracias también a los compañeros de laboratorio, a todas las Carmenes: "Gon", "Pe", "Carmen Cas", M^a José, Nuria, Alberto, Esther, Lidia, Consuelo, Gonzalo y Luis Fernando, por su apoyo y por hacer del lugar de trabajo una pequeña familia. A mis chicas Paula, Marta, Bea, Marivi y a Ismael por ... tanto, porque sin vosotros todo hubiera resultado mucho más difícil. Y como en toda familia, esos padres tan queridos como han terminado siendo los directores de tesis, Beatriz, Marisol y Mariano, gracias por haber cambiado el concepto "jefes". A mi familia, padres y hermanos por hacerme sentir tan querida y apoyada, por ser tan afortunada de tenerlos; y cómo no, a Jose Ignacio, "mi marío, mi Jose" por la paciencia, el amor, la comprensión y por estar a mi lado. A los amigos, los siempre presentes tanto en persona como en esas llamadas telefónicas tan amenas y duraderas y esos más ausentes. A los conocidos y desconocidos. Porque esta tesis es de todos vosotros, porque sin vosotros esto no se podría haber llevado a cabo. No imagino cómo agradecer tanto en tan poco espacio y tiempo así que espero que estas líneas den una idea de lo agradecida que me siento pues lo bueno, si breve, dos veces bueno. Solo me queda desear que hayáis disfrutado de mi compañía tanto como yo de la vuestra y ahora, a disfrutar de esta tesis.

Este trabajo ha sido posible gracias al soporte económico de la Fundación CEU-San Pablo y del Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF-2006-02456). Rocío Guzmán Ruiz ha sido becaria de la Universidad San Pablo-CEU

| | PÁGINA |
|---|--------|
| INTRODUCCIÓN | |
| 1.- La obesidad | 1 |
| 2.- El tejido adiposo | 3 |
| 3.- La leptina | |
| 3.1.- Introducción | 5 |
| 3.2.- Receptor de leptina | 6 |
| 3.3.- Vías de señalización | |
| 3.3.1.- vía Jak/STAT | 7 |
| 3.3.2.- vía PI3K | 8 |
| 3.3.3.- vía MAPK | 9 |
| 3.4.- Efectos de la leptina | 9 |
| 3.5.- Resistencia a leptina | 10 |
| 4.- El modelo de obesidad inducida por la dieta | 12 |
| 5.- Metabolismo cardíaco | 13 |
| 5.1.- Metabolismo de los ácidos grasos | 14 |
| 5.2.- Metabolismo de los hidratos de carbono | |
| 5.2.1.- Metabolismo de la glucosa | 17 |
| 5.2.2.- Metabolismo del lactato | 21 |
| 6.- Adaptaciones del metabolismo cardíaco | 22 |
| 6.1.- Termogénesis | 22 |
| 6.2.- Incremento de β -oxidación | |
| 6.2.1.- Proteinkinasa dependiente de AMP | 24 |
| 6.2.2.- Complejo carnitin-palmitoiltransferasa | 26 |
| 7.- Consecuencias derivadas de las adaptaciones metabólicas | 28 |
| 7.1.- Formación de radicales libres | 28 |
| 7.2.- Daño mitocondrial | 30 |

| | |
|--|-----------|
| HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 32 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 34 |
| 1.- Animales de experimentación | 34 |
| 2.- Tratamientos | 34 |
| 3.- Control del peso y de ingesta | 35 |
| 4.- Obtención de las muestras | 35 |
| 5.- Determinaciones bioquímicas en plasma | |
| 5.1.- Determinación de insulina | 36 |
| 5.2.- Determinación de glucosa | 36 |
| 5.3.- Determinación de ácidos grasos libres no esterificados | 37 |
| 5.4.- Determinación de triglicéridos | 38 |
| 5.5.- Determinación de leptina | 38 |
| 5.6.- Determinación de adiponectina | 39 |
| 6.- Determinación de lípidos en tejido adiposo mesentérico e hígado | 39 |
| 7.- Determinaciones en corazón | |
| 7.1.- Determinación de triglicéridos | 40 |
| 7.2.- Determinación de adenosin-trifosfato | 41 |
| 7.3.- Determinación de lactato | 41 |
| 7.4.- Determinación de la actividad lactato deshidrogenasa | 42 |
| 7.5.- Determinación de la actividad carnitin-palmitoiltransferasa | 43 |
| 7.6.- Determinación de la actividad piruvato deshidrogenasa | 44 |
| 7.7.- Determinación de la actividad citrato sintasa | 44 |
| 7.8.- Determinación de la actividad glucosa-6-fosfato deshidrogenasa | 45 |
| 7.9.- Determinación de la producción de anión superóxido | 46 |

| | |
|--|-----------|
| 8.- Técnica de Western blot | |
| 8.1.- Obtención de las muestras a partir de los diferentes tejidos (corazón, hígado, hipotálamo y tejido adiposo lumbar) | 47 |
| 8.2.- Determinación de la concentración de proteínas totales | 47 |
| 8.3.- Detección de proteínas por Western blot | 48 |
| 8.3.1.- Detección del grado de fosforilación de STAT3 | 49 |
| 8.3.2.- Detección de las proteínas desacoplantes de membrana 1, 2 y 3 | 50 |
| 8.3.3.- Detección del grado de fosforilación de AMPK | 50 |
| 8.3.4.- Detección del grado de fosforilación de Akt | 51 |
| 8.3.5.- Detección de las proteínas antioxidantes: Mn-SOD, Cu/Zn-SOD y catalasa | 51 |
| 9.- Microscopía electrónica de corazón | 52 |
| 10.- Parámetros hemodinámicos y Electrocardiograma | 52 |
| 11.- Análisis estadístico | 53 |
| CAPÍTULO I: Caracterización del modelo DIO | 54 |
| Introducción | 55 |
| Resultados | |
| 1.- Evolución del peso corporal | 57 |
| 2.- Determinación de la ingesta | 58 |
| 3.- Cálculo de la eficiencia calórica | 59 |
| 4.- Evolución del peso de los tejidos adiposos mesentérico y lumbar, hígado y corazón. | 59 |
| 5.- Cuantificación de los parámetros plasmáticos | 62 |
| 6.- Cuantificación de lípidos en el tejido adiposo mesentérico, el hígado y el corazón. | 64 |

| | |
|--|-----------|
| 7.- Respuesta a leptina. Fosforilación de la STAT-3 a nivel central y periférico. | |
| Hipotálamo | 65 |
| Tejido adiposo lumbar | 66 |
| Hígado | 67 |
| Corazón | 68 |
| Discusión | 69 |
| | |
| CAPÍTULO II: | |
| Metabolismo cardiaco: adaptaciones tempranas en el modelo DIO | 73 |
| Introducción | 74 |
| Resultados | |
| 1.- Evolución del peso corporal, los tejidos y el contenido graso de los mismos | 76 |
| 2.- Detección de la UCP-2 en corazón | 76 |
| 3.- Cuantificación de la concentración de ATP en corazón | 77 |
| 4.- Detección de pAMPK y AMPK | 78 |
| 5.-Determinación de la concentración de lactato y de la actividad lactato deshidrogenasa (LDH) en corazón. | 79 |
| Discusión | 81 |
| | |
| CAPÍTULO III: | |
| Metabolismo cardiaco: adaptaciones tardías en el modelo DIO. | |
| Regulación de la actividad carnitina-palmitoiltransferasa cardiaca por leptina | 84 |
| Introducción | 85 |
| Resultados | |
| 1.- ANIMALES CON HIPERLEPTINEMIA EXÓGENA | |
| 1.1.- Determinación de la actividad carnitin-palmitoiltrasnferasa y su regulación por malonil-CoA | 87 |
| 1.2.- Señalización de leptina en corazón | 89 |

| | |
|---|------------|
| 2.- ANIMALES CON HIPERLEPTINEMIA ENDÓGENA | |
| 2.1.- Determinación de la actividad carnitin-palmitoiltransferasa y su regulación por malonil-CoA | 91 |
| 2.2.- Señalización de leptina | 93 |
| Discusión | 95 |
| | |
| CAPÍTULO IV: | |
| Metabolismo cardíaco: alteraciones tardías en el modelo DIO | 98 |
| Introducción | 99 |
| Resultados | |
| 1.- Determinación del peso corporal, del corazón y perfil bioquímico | 101 |
| 2.- Determinación del metabolismo energético | 101 |
| 3.- Determinación de la expresión de proteínas desacoplantes | 102 |
| 4.- Estrés oxidativo y sistemas antioxidantes | |
| 4.1.- Determinación de la concentración de anión superóxido | 103 |
| 4.2.- Determinación de la expresión de enzimas antioxidantes superóxido dismutasas (Mn-SOD y Cu/zn-SOD) y catalasa | 104 |
| 4.3.- Determinación de la actividad glucosa-6-fosfato deshidrogenasa | 105 |
| 5.- Morfología cardíaca y daño mitocondrial | 106 |
| 6.- Determinación de los parámetros hemodinámicos y el electrocardiograma | 109 |
| Discusión | 111 |
| | |
| CONCLUSIONES | 115 |
| | |
| BIBLIOGRAFÍA | 117 |
| | |
| APÉNDICE | 136 |

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

| <u>INDICE DE FIGURAS</u> | PÁGINA |
|---|--------|
| FIGURA 1. Efecto de la dieta sobre la evolución del peso corporal | 57 |
| FIGURA 2. Evolución de la ingesta expresada en gramos (a) o en calorías (b) | 58 |
| FIGURA 3. Evolución de la eficiencia calórica a lo largo del tratamiento dietético. | 59 |
| FIGURA 4. Evolución del peso relativo de los diferentes tejidos adiposos, lumbar y mesentérico, del hígado y del corazón a lo largo del tratamiento dietético. | 60 |
| FIGURA 5. Correlaciones entre la cantidad de tejido adiposo (lumbar y mesentérico) y los niveles de leptina plasmática tras 8 (a), 16 (b) y 32 (c) semanas de dieta. | 62 |
| FIGURA 6. Determinación del pSTAT3/STAT3 en el hipotálamo tras 8 semanas de dieta. | 65 |
| FIGURA 7. Determinación del pSTAT3/STAT3 en el tejido adiposo lumbar (TAL) tras 8 (a) y 16 (b) semanas de dieta. | 66 |
| FIGURA 8. Determinación del pSTAT3/STAT3 en el hígado tras 8 (a), 16 (b) y 32 (c) semanas de dieta. | 67 |
| FIGURA 9. Determinación del pSTAT3/STAT3 en el corazón tras 8 (a) y 32 (b) semanas de dieta. | 68 |
| FIGURA 10. Efecto de la dieta sobre la expresión de la UCP-2 cardiaca tras 4, 8 y 16 semanas de tratamiento dietético. | 76 |
| FIGURA 11. Correlación entre la concentración de leptina plasmática y la expresión de la UCP-2 (a); y correlación entre la cantidad de TAL y la expresión de la UCP-2 (b). | 77 |
| FIGURA 12. Determinación del pAMPK/AMPK en corazón tras 4, 8 y 16 semanas de tratamiento dietético. | 78 |
| FIGURA 13. Concentración de lactato y actividad LDH en corazón. | 79 |
| FIGURA 14. Correlación entre la expresión de UCP-2 y el contenido de lactato en corazón (a) y correlación entre pAMPK/AMPK y el contenido de lactato en corazón (b). | 80 |
| FIGURA 15. Efecto de la administración de leptina (1 mg/kg) sobre la inhibición de la actividad de CPT cardiaca por malonil-CoA (0-100 μmol/L). | 87 |

| | |
|--|------------|
| FIGURA 16. Correlación entre la concentración de leptina plasmática y la actividad CPT en presencia de 50 $\mu\text{mol/L}$ malonil-CoA en mitocondrias aisladas de corazón de animales con hiperleptinemia exógena | 88 |
| FIGURA 17. Efecto del malonil-CoA sobre la actividad CPT en explantes de corazón incubados con 10 $\mu\text{g/ml}$ de leptina | 88 |
| FIGURA 18. Efecto de la leptina (1mg/kg ip) sobre la fosforilación de la STAT-3 (a) y de la Akt (b) en corazón | 89 |
| FIGURA 19. Correlación entre (a) la concentración de leptina plasmática y pAkt/Akt, y (b) pAkt/Akt y la actividad de CPT no sensible a malonil-CoA (50 $\mu\text{mol/l}$), en corazón de animales tratados leptina | 90 |
| FIGURA 20. Determinación del porcentaje de inhibición de la actividad CPT en presencia de malonil-CoA (50 $\mu\text{mol/l}$) en corazón de animales con hiperleptinemia exógena y TCB | 90 |
| FIGURA 21. Determinación del porcentaje de inhibición de la actividad CPT en presencia de malonil-CoA (50 $\mu\text{mol/l}$) en corazón de animales con hiperleptinemia endógena. | 91 |
| FIGURA 22. Determinación del porcentaje de inhibición de la actividad CPT en presencia de malonil-CoA (50 $\mu\text{mol/l}$) en corazón de animales <i>high fat</i> tras la administración de leptina aguda. | 92 |
| FIGURA 23. Determinación de la fosforilación de la Akt en el corazón de animales con hiperleptinemia endógena | 93 |
| FIGURA 24. Correlación entre la concentración de leptina plasmática y pAkt/Akt (a) y correlación entre pAkt/Akt y la actividad CPT no sensible a malonil-CoA (50 $\mu\text{mol/l}$) (b) en corazón de animales con hiperleptinemia endógena. | 93 |
| FIGURA 25. (a) Determinación del pAMPK/AMPK en el corazón de animales con hiperleptinemia endógena. (b) Correlación entre pAMPK/AMPK y pAkt/Akt en corazón de animales con hiperleptinemia endógena | 94 |
| FIGURA 26. Expresión de la UCP-3 cardíaca en animales de 32 semanas de tratamiento dietético | 102 |
| FIGURA 27. Producción de anión superóxido en corazón tras 32 semanas de tratamiento dietético | 103 |
| FIGURA 28. Efecto de la dieta sobre la expresión de la Mn-SOD y la Cu/Zn-SOD en corazón después de 32 semanas de dieta | 104 |
| FIGURA 29. Efecto de la dieta sobre la expresión de la catalasa en corazón después de 32 semanas de tratamiento dietético | 105 |
| FIGURA 30. Representación gráfica del electrocardiograma tras 32 semanas de tratamiento dietético | 110 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|--|------------|
| TABLA 1. Evolución del peso absoluto los diferentes tejidos a lo largo del tratamiento dietético. | 61 |
| TABLA 2. Determinaciones plasmáticas a lo largo del tratamiento dietético | 63 |
| TABLA 3. Contenido lipídico en el tejido adiposo mesentérico e hígado a lo largo del tratamiento. | 64 |
| TABLA 4. Contenido de triglicéridos cardiacos a lo largo del tratamiento | 64 |
| TABLA 5. Contenido de ATP cardiaco tras 4, 8 y 16 semanas de tratamiento | 77 |
| TABLA 6. Metabolismo cardiaco tras 32 semanas de tratamiento dietético | 102 |
| TABLA 7. Actividad glucosa-6-fosfato deshidrogenasa cardiaca tras 32 semanas de tratamiento dietético | 105 |
| TABLA 8. Ondas que componen el electrocardiograma | 110 |

ABREVIATURAS

| | |
|--------------|---|
| ACC | Acetil coenzima-A carboxilasa |
| ACS | Acil Cenzima-A sintasa |
| AG | Ácidos grasos |
| AgRP | <i>Agouti related protein</i> |
| AMPK | Proteína quinasa activada por AMP |
| Akt/PKB | Proteína-quinasa B |
| CART | Transcrito regulado por cocaína y anfetamina |
| CAT | Ciclo de los ácidos tricarboxílicos |
| cte | Cadena de transporte electrónico |
| CL | Citrato liasa |
| CPT | Carnitin-palmitoiltransferasa |
| CS | Citrato sintasa |
| Cu/Zn-SOD | Cobre/Zinc superóxido dismutasa |
| DIO | Obesidad inducida por dieta (<i>Diet Induced Obesity</i>) |
| FABP | <i>Fatty acids binding protein</i> |
| FADH | Flavin adenindinucleótido |
| FAS | Ácido graso sintasa |
| FAT | Ácido graso traslocasa |
| G6P | Glucosa 6-fosfato |
| G6PDH | Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa |
| GLUT-4 | Transportador de glucosa-4 |
| GSH/GSSG | Glutation reducido y oxidado |
| HF | <i>High fat</i> |
| IKK- β | IK quinasa- β |
| IRS-1/IRS-2 | sustrato para receptor de insulina 1 y 2 |
| IMC | Índice de masa corporal |
| JAK | <i>Janus kinase</i> |
| JNK | Jun quinasa |
| LDH | Lactato deshidrogenasa |
| LF | <i>Low fat</i> |
| LPL | Lipoproteína lipasa |
| MAPK | <i>Mitogen activated protein kinase</i> |
| MCT | Transportador de lactato |
| MnSOD | Manganeso superóxido dismutasa |
| NADH | Nicotinamida adenindinucleótido |
| NEFA | Ácidos grasos no esterificados |
| NPY | Neuropéptido Y |
| Ob-R | Receptor de leptina |

| | |
|---------------|--|
| PDH | Piruvato deshidrogenasa |
| PFK-1 | Fosfofructoquinasa-1 |
| PGL | Fosfogluco lactonasa |
| PI3K | Fosfatidinositol-3-quinasa |
| POMC | Proopiomelanocortina |
| PTP1B | <i>Protein tyrosine phosphatase 1B</i> |
| ROS | Especies reactivas de oxígeno |
| SOCS-3 | <i>Supresor of cytokine signalling-3</i> |
| STAT | <i>Signal transducers and activators of transcription</i> |
| TG | Triglicéridos |
| TNF- α | Factor de necrosis tumoral alfa |
| UCP | Proteínas desacoplantes de membrana (<i>Uncouplin protein</i>) |
| 6PGDH | 6-fosfogluconato deshidrogenasa |

INTRODUCCIÓN

1.- LA OBESIDAD

La obesidad constituye un factor de riesgo independiente para el desarrollo de enfermedades metabólicas y cardiovasculares, convirtiéndose en la segunda causa de mortalidad prematura evitable, después del tabaquismo (Consenso SEEDO 2007). Los costes debidos al tratamiento de las enfermedades derivadas de la obesidad alcanzan casi el 7% del gasto sanitario español (DELPHI, 2002). En España, la prevalencia de obesidad en la edad adulta (25-64 años) es del 15.5%, siendo mayor en mujeres que en hombres (Estudio DORICA) e incrementándose significativamente (21%) con la edad en ambos sexos (Aranceta et al., 2005). Igualmente, en la edad infantil también se viene observando un incremento en su prevalencia. Así el estudio *enKid* estima que la prevalencia de obesidad infantil es del 14% (Estudio *enKid*, 1998-2000) frente al 6.4% detectado en el estudio anterior (Estudio PAIDOS, 1984). Este aumento también se observa en Europa, destacando la alta prevalencia en Reino Unido, seguido de España, y en último lugar Francia, Italia y Suecia, donde se obtienen los valores más bajos (7%) (Varo et al, 2002). Sin embargo, es en EEUU donde la obesidad alcanza los valores más elevados, siendo más del 20% de la población obesa (Flegal et al., 1998).

La obesidad es una enfermedad compleja, resultado de la interacción de factores genéticos y ambientales. Es posible identificar de forma independiente la obesidad de origen genético de la obesidad de origen ambiental. Aunque en la mayoría de las ocasiones resulta difícil establecer un único factor causante, el continuo incremento de su prevalencia no puede deberse únicamente al componente genético, por lo que cada vez toma más importancia el componente ambiental. En la actualidad el estilo de vida cada vez más sedentario y el consumo de comidas precocinadas o comidas rápidas ricas en grasas saturadas parecen ser las principales causas de obesidad.

La obesidad se puede definir como un aumento de la grasa corporal, que se traduce fundamentalmente en un incremento del peso corporal. En la práctica clínica, para establecer una clasificación del grado de obesidad se utiliza el índice de Quetelec o índice de masa corporal (IMC). El IMC se define como el cociente entre el peso (kg) y la talla (m²), y permite clasificar los diferentes grados de obesidad que presenta un individuo (Ver tabla 1)

| Individuo con... | IMC (kg/m ²) |
|-------------------|--------------------------|
| Peso insuficiente | < 18.5 |
| Normopeso | 18.5-24.9 |
| Sobrepeso tipo I | 25-26.9 |
| Sobrepeso tipo II | 27-29.9 |
| Obesidad tipo I | 30-34.9 |
| Obesidad tipo II | 35-39.9 |
| Obesidad mórbida | 40-40.9 |
| Obesidad extrema | > 50 |

Tabla 1. Clasificación de los distintos grados de obesidad en función del índice de masa corporal (IMC) según el consenso SEEDO'2000

Hasta hace poco tiempo el IMC se utilizaba como un factor indicativo de riesgo para padecer resistencia a insulina, diabetes tipo II, dislipemias, afecciones coronarias, hipertensión arterial o insuficiencia cardiaca (Flegar et al., 1988; Pi-Sunyer et al., 2002). Sin embargo, cada vez son más las evidencias que muestran que un IMC elevado no siempre se asocia con las patologías anteriores. De hecho se ha demostrado que pacientes con insuficiencia cardiaca e IMC elevado presentan una menor tasa de mortalidad que los pacientes con insuficiencia cardiaca e IMC normal o bajo (Horwich et al., 2002; Zamora et al., 2007; Arthman y Ventura, 2007). Una de las hipótesis que trata de explicar esta paradoja es que no es tanto la cantidad de grasa presente en el organismo como la distribución de la misma, la responsable del daño asociado a la obesidad (Wajchenberg, 2000; Unger, 2003; Weiss, 2007). En clínica, uno de los parámetros más utilizados para evaluar la distribución de la grasa corporal es el cociente cintura-cadera, que diferencia la obesidad: i) ginecoide (La grasa se acumula en la región glúteofemoral; cociente < 1 en hombres; y < 0.9 en mujeres) y ii) androide (Central o visceral, la grasa se acumula en la región abdominal; cociente > 1 en hombres y > 0.9 en mujeres). Este cociente es un indicador de riesgo para padecer enfermedades cardiovasculares asociadas a la obesidad, aunque también se sabe que el aumento de la masa visceral se asocia con alteraciones metabólicas como la resistencia a insulina o las dislipemias (Hausman et al., 2001, Yusuf et al., 2004, Weiss, 2007). Una de las principales causas es que la grasa visceral es metabólicamente más activa que la grasa subcutánea y libera una serie de mediadores que pueden tener efectos perjudiciales para la salud (Weiss, 2007; Fain et al., 2004).

2.- EL TEJIDO ADIPOSO

El tejido adiposo se encuentra ampliamente distribuido alrededor de los órganos y de los vasos sanguíneos, bajo la piel y en la cavidad abdominal. En función de esta localización se pueden distinguir tres áreas principales: dermal, subcutánea e intraperitoneal o visceral (mesentérica, omental, lumbar y epididimal) (Märin et al., 1996; Wajchenberg, 2000). La principal función del tejido adiposo es actuar como reservorio energético del organismo, almacenando el exceso de grasa en forma de triglicéridos (TG), lo que permite hacer frente a situaciones como el ejercicio físico intenso o el ayuno prolongado, que requieren una demanda extra de energía. Sin embargo, el tejido adiposo también actúa como órgano endocrino secretando adipocinas como la leptina y la adiponectina que intervienen en el control del metabolismo energético (Ahima, 2006).

El tejido adiposo está compuesto principalmente por adipocitos y por la fracción del estroma vascular. Los adipocitos son el componente más abundante del tejido adiposo y son los encargados de almacenar la grasa en su interior. Estas células presentan inicialmente una amplia variabilidad en su tamaño, que disminuye a medida que se desarrolla la obesidad hasta alcanzar el tamaño máximo del adipocito (Hausman et al., 2001; Frayn 2002). La fracción del estroma vascular está formada por macrófagos, fibroblastos, células sanguíneas, células endoteliales, células madre mesenquimales y preadipocitos. Dicha fracción es importante ya que es la responsable de casi el 90% de las adipocinas liberadas por el tejido adiposo a excepción de la leptina y la adiponectina que son secretadas directamente por el adipocito (Fayn et al., 2004; Lafontan, 2005; Langin et al., 2009).

La obesidad es una consecuencia del desequilibrio entre el aporte calórico y el gasto energético. Los TG procedentes de la dieta son la principal fuente de energía para tejidos como el corazón o el músculo esquelético en reposo. La parte no utilizada de los mismos es captada y almacenada en el tejido adiposo (Frayn, 2002), de esta forma, el tejido adiposo limita la acumulación de lípidos en tejidos no adiposos y evita los fenómenos de lipotoxicidad (Unger, 2003). Además, el tejido adiposo secreta adipocinas como la leptina que favorece la β -oxidación en tejidos oxidativos (Lee et al., 2001; Minokoshi et al., 2002; Unger, 2005) al tiempo que estimula la lipólisis limitando la actividad lipogénica en el tejido adiposo (Wang et al., 1999).

Así, podemos considerar que el tejido adiposo funciona de forma incorrecta cuando: i) disminuye o se altera su capacidad para almacenar lípidos, fundamentalmente en forma de TG, ii) se altera el patrón de síntesis y/o liberación de adipoquinas y iii) sintetiza mediadores que normalmente no produce. Un excesivo aporte energético prolongado en el tiempo puede comprometer la capacidad de almacenar lípidos en el tejido adiposo (Hausman et al., 2001) y promover la captación de los mismos por otros tejidos dando lugar a depósitos ectópicos de lípidos y a lipotoxicidad. Si se acumulan en músculo esquelético se origina resistencia a insulina, si lo hacen en hígado se origina hígado graso, y si es en corazón se generan cardiomiopatías (Unger, 2003; Unger, 2005).

El aumento de tejido adiposo se asocia con un aumento de la secreción de leptina. Como se mencionaba anteriormente, la leptina ejerce un papel fundamental en el control de la reserva y el gasto energético. Sin embargo, una situación de hiperleptinemia prolongada, como la que tiene lugar en la obesidad, puede desembocar en la aparición de resistencia a leptina y en la pérdida de su acción antilipogénica (Wang et al., 2001) que conlleva al desarrollo de lipotoxicidad (Unger, 2003). Además, la obesidad se asocia con la disminución de adiponectina, que también controla el metabolismo energético modulando la captación y utilización de los ácidos grasos (AG) y de la glucosa (Kadowaki and Yamahuchi., 2005). De hecho, el déficit de adiponectina se asocia con obesidad, resistencia a insulina y diabetes (Barnea et al., 2006; Bullen et al., 2007). El tejido adiposo del individuo obeso libera otras citoquinas como el factor de necrosis tumoral (TNF- α) o la resistina, que agravan la patogenia de la obesidad. El TNF- α activa la IKB-quinasa- β (IKK β) y la Jun-quinasa (JNK) que incrementan la fosforilación de los sustratos para el receptor de insulina 1 y 2 (IRS-1 y 2). El estímulo prolongado de los mismos provoca la desensibilización del receptor de insulina causando resistencia a la hormona en músculo esquelético e hígado (Hotamisligil, 1999; Hirosumi et al., 2002). Igualmente un incremento de resistina en plasma se asocia a resistencia a insulina (Steppan et al., 2001) y a un aumento de la expresión de SOCS-3, un potente inhibidor de vías de señalización de insulina y de leptina como la de la Jak/STAT (Steppan et al., 2005).

3.- LA LEPTINA

3.1.- INTRODUCCIÓN

En 1953, Kennedy propuso la existencia de un factor humoral liberado por el tejido adiposo capaz de informar al sistema nervioso central del estado de las reservas grasas. Posteriormente, los estudios de Hervey (1958) y más tarde los de Coleman (1973) mostraron la presencia de un factor circulante capaz de regular el metabolismo energético, pero no fue hasta 1994 cuando se consiguió identificar y clonar dicho factor al que se denominó leptina (Zang et al., 1994). Su descubrimiento supuso uno de los más importantes avances en la investigación de la fisiopatología de la obesidad. A partir de ese momento, muchos son los estudios que se han llevado a cabo para elucidar el mecanismo por el que la leptina ejerce sus efectos, no sólo sobre el control de la ingesta sino también sobre el gasto energético.

La leptina, en su forma madura, está formada por 146 aminoácidos y tiene un peso molecular de 16 KDa. Posee una estructura terciaria con cuatro hélices similar a la de las citoquinas de clase I (Zhang et al., 1994). La leptina está codificada por el gen *ob*, localizado en el cromosoma 6 en ratón, y en el cromosoma 7 en el ser humano. Su estructura es similar entre las especies presentando una homología del 84% con la de ratón y un 83% con la de rata (Simón and del Barrio, 2002). La síntesis de leptina se lleva a cabo principalmente en el tejido adiposo y en otros tejidos como la placenta, el estómago o el hígado (Simón and del Barrio, 2002). Su secreción es pulsátil y presenta un ritmo circadiano, aumentando en las horas de luz en humanos y de oscuridad en roedores. Una vez en la sangre, la leptina se encuentra en forma libre o bien unida a proteínas plasmáticas (Sinha et al., 1996). Sus niveles plasmáticos oscilan entre 1-15 ng/ml en individuos con normopeso, y hasta 30 ng/ml en individuos obesos. Su semivida es de 25 min para la forma endógena y de 90 min para la exógena y su eliminación es por vía renal. La secreción de leptina está influida por diferentes factores. Así la edad, las dietas ricas en grasas, la insulina o los glucocorticoides aumentan la producción de leptina, mientras que el ayuno, el ejercicio físico, el calor o la estimulación adrenérgica la inhiben (Sinha et al., 1996; Ahrén et al., 1997; Szkundelski 2007).

3.2.- RECEPTOR DE LEPTINA

El receptor de leptina (Ob-R) fue identificado como una proteína de membrana similar a los receptores de las citoquinas de clase I (Tartaglia et al., 1995). Se han identificado 6 isoformas del receptor (Ob-Ra, Ob-Rb, Ob-Rc, Ob-Rd, Ob-Re y Ob-Rf). Todas ellas constan de un dominio extracelular, que contiene el sitio de unión para la leptina, un dominio transmembrana común a todas las isoformas, que constituye el sitio de anclaje del receptor a la membrana celular, y un dominio intracelular que difiere entre las distintas isoformas y que permite clasificarlas en cortas (Ob-Ra, Ob-Rc, Ob-Rd, y Ob-Rf), larga (Ob-Rb) y soluble, que carece de dicho dominio (Ob-Re) (Tartaglia et al., 1995).

La isoforma soluble del receptor, Ob-Re, es la forma más corta. Carece de regiones transmembrana y citosólica. Circula en sangre y tiende a unirse a la leptina libre circulante (Lammert et al., 2001) actuando como sistema tampón y regulando sus niveles plasmáticos (Löllmann et al, 1997; Chan et al., 2002). La isoforma larga, Ob-Rb, contiene los elementos necesarios para llevar a cabo la señalización intracelular. Cuenta con la región citoplasmática de mayor longitud y presenta las regiones BOX-1 y BOX-2, por lo que se considera la forma funcional (Bjorbaek et al, 1997). Un fallo en la expresión de dicha isoforma se asocia con obesidad, resistencia a insulina y daño cardíaco (Chua y cols, 1996; Ren et al., 2008; Dixon et al., 2009). El resto de isoformas se denominan isoformas cortas y se distinguen en función de la longitud de la región citoplasmática. Ob-Ra contiene 34 aminoácidos mientras que Ob-Rc tiene 32 y Ob-Rd, 40. Cuentan con una región citoplasmática más corta que Ob-Rb y sólo contienen la región BOX1. Son capaces de reclutar proteínas Jaks (Murakami et al., 1991) y parece que están relacionadas con la internalización y la degradación de la leptina (Uotani et al., 1999) así como con el transporte de la misma, través de la barrera hematoencefálica y del plexo coroideo, al cerebro (Bjorbaek et al, 2004).

Se ha detectado la expresión del receptor de leptina en hipotálamo y en otras regiones del sistema nervioso central (Bjorbaek et al, 1998), así como en tejidos periféricos como el bazo, el riñón, el hígado, el músculo esquelético y el tejido adiposo (Hoggard et al, 1997; Lin et al, 2000). En el corazón se ha descrito la presencia de receptores Ob-Ra, Ob-Rb y Ob-Re (Purdham et al., 2004).

3.3.- VÍAS DE SEÑALIZACIÓN

La principal vía de señalización acoplada al receptor de leptina es la vía JAK-STAT (*Janus kinase-signal transducers and activators of transcription*). Otras vías descritas son la vía fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) y la vía MAP-quinasa (MAPK).

3.3.1.- Vía JAK/STAT

Cuando la leptina se une a su receptor, éste se dimeriza permitiendo la unión de las proteínas JAK-2 en la región BOX-1, localizada en la región intracelular. Las proteínas JAK-2, con actividad tirosinquinasa intrínseca, fosforilan el receptor de leptina en los residuos Tyr⁹⁸⁵ y Tyr¹¹³⁸ permitiendo la unión a proteínas que contienen el dominio SH₂, como la STAT (Börbaeck et al., 2001). Seguidamente, la STAT se fosforila en el residuo Tyr⁷⁰⁵ (pSTAT), se separa del receptor y forma un heterodímero que trasloca al núcleo, donde se une a secuencias específicas de ADN activando genes relacionados con la homeostasis energética (Vaisse et al., 1996; Brown et al., 2001) (Figura 1a).

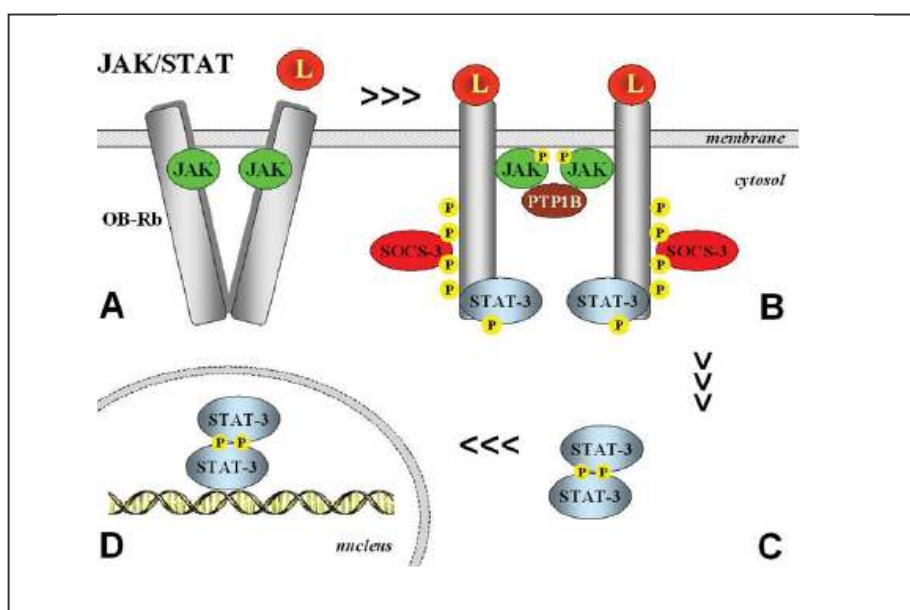


Figura 1a. Señalización de leptina a través de la activación de la vía Jak/STAT-3. La inhibición de esta vía de señalización se lleva a cabo a través de la activación de otras proteínas (SOCS-3 o PTP1B) que inhiben la señal. (L) leptina, (SOCS-3), citoquina supresora de señal, (PTP1B) tirosinofosfatasa 1B. Tomada de Frühbeck, 2006.

En el hipotálamo, la fosforilación de STAT-3 (pSTAT-3) se asocia con la pérdida de peso y el aumento del gasto energético (Gao et al., 2004). En el tejido adiposo, la activación de la STAT-3 aumenta la oxidación de AG (Park et al., 2006). Por el contrario, la defosforilación de la STAT-3 se relaciona con la hipertrofia del adipocito y con la pérdida del efecto lipogénico de la leptina (Cernokovich et al., 2008). En el hígado, un aumento de la

expresión del receptor de leptina y de la pSTAT-3 reducen el contenido de TG y colesterol (Zeng et al., 2009), mientras que la pérdida de pSTAT-3 favorece la acumulación de TG y la aparición del hígado graso (Roglans et al., 2007). En corazón, la pSTAT-3 ejerce un efecto cardioprotector al estimular la expresión de enzimas antioxidantes como la manganeso superóxido dismutasa (Mn-SOD) (Negoro et al., 2001). También se ha detectado una relación entre la p-STAT-3 y la aparición de hipertrofia cardíaca como mecanismo compensatorio en situaciones de estrés cardíaco (Hilfiker-Kleiner et al., 2004). Por el contrario, una disminución de la fosforilación de STAT-3 favorece la aparición de fibrosis y apoptosis cardíaca (Rupper and Meyer, 2007). Igualmente se ha descrito en cardiomiocitos y hepatocitos aislados de ratones con ausencia de STAT-3 una disminución de la actividad de los complejos I y II de la cadena de transporte electrónico y una alteración de la homeostasis celular (Wegrzyn et al., 2009).

3.3.2.- Vía fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K)

La vía PI3-quinasa es activada tanto por la insulina como por la leptina (Frühbeck, 2006) (Figura 1b). La unión de la leptina a su receptor permite la unión de otros componentes como el IRS, que es fosforilado por el receptor de leptina. Esta fosforilación favorece la unión y activación de otras moléculas como la proteínquinasa B (Akt), implicada en la regulación de múltiples procesos. En el corazón, la activación de Akt está implicada en la regulación del crecimiento cardíaco, la contracción cardíaca y la angiogénesis (Catalucci et al., 2008).

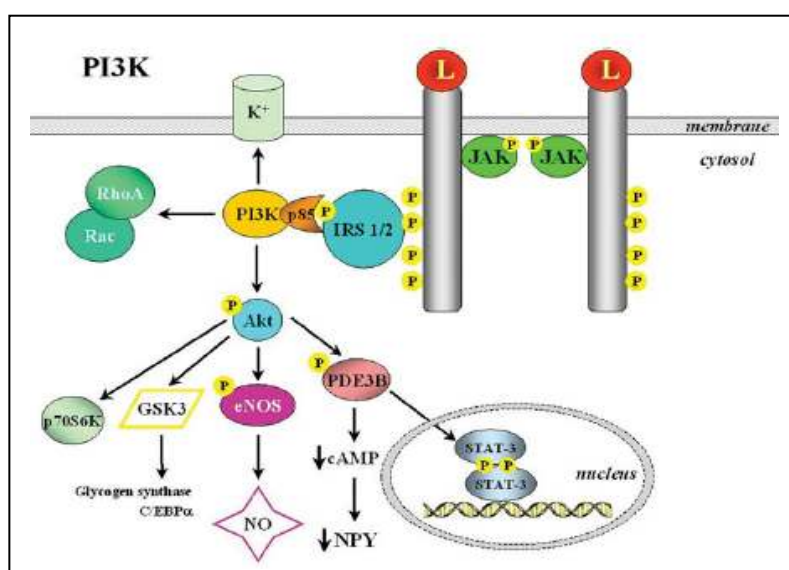


Figura 1b. Señalización de leptina a través de la activación de la vía PI3K. Tomada de Frühbeck, 2006.

3.3.3.- Vía MAP-quinasa (MAPK)

Otra vía de señalización del receptor de leptina es la ruta Ras/Raf/ERK (extracellular-signal-regulated-kinase) o MAP-quinasa (Figura 1c). La fosforilación del receptor de leptina en el residuo Tyr⁹⁸⁵ también sirve de unión para las proteínas ERK, a través de la activación del dominio SH₂ (Börbaek et al., 2001). Esta vía se activa con la unión de la leptina a su isoforma larga, OB-Rb, y corta, Ob-Ra del receptor (Börbaek et al., 1997). Su activación conduce a la expresión de genes como *c-fos* y *erg-1*, relacionados con la proliferación y la diferenciación celular (Frühbeck, 2006). En corazón la activación de la ERK ejerce un efecto antiapoptótico (Zhai et al., 2007; Jin et al., 2008; Li et al., 2009).

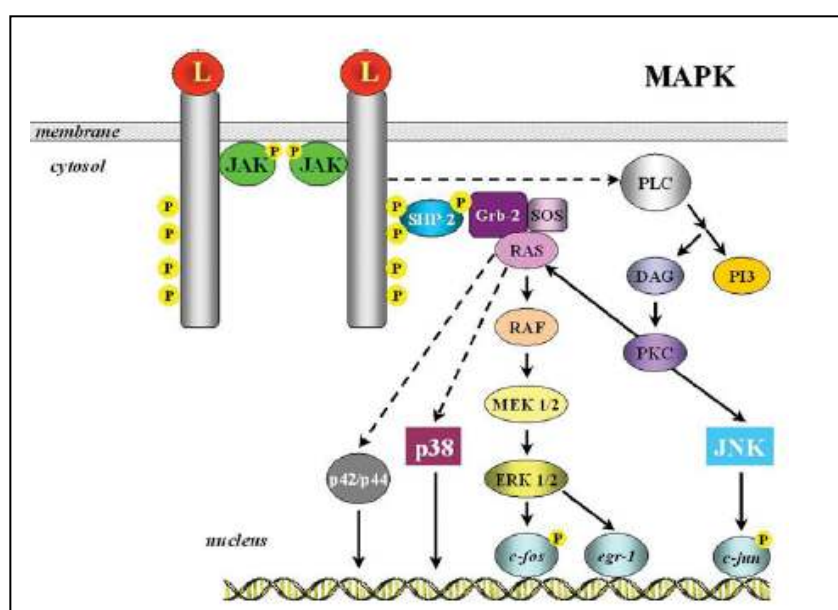


Figura 1c. Señalización de leptina a través de la activación de la vía MAPK. Tomada de Frühbeck, 2006.

3.4.- EFECTOS DE LA LEPTINA

La principal función de la leptina es controlar la ingesta y el gasto energético. Para ello, la leptina ejerce acciones tanto a nivel central como a nivel periférico. A nivel central, la leptina actúa de manera directa sobre el núcleo paraventricular disminuyendo la expresión de péptidos orexigénicos como el neuropéptido Y (NPY) y la AgRP (*agouti related protein*) y aumentando la expresión de otros péptidos anorexígenos como la proopiomelanocortina (POMC) y el transcrito regulado por cocaína y anfetamina (CART) (Elmquist et al., 1996; Schwartz et al., 2000; Stanley et al., 2005). De manera indirecta la leptina aumenta la actividad simpática dando lugar a un aumento de la termogénesis y

del gasto energético (Friedman and Haalas, 1998; Minokoshi et al., 2002). Otro sustrato relacionado con el control de la ingesta es el malonil-CoA. Así se ha demostrado que la administración de C75, un inhibidor de la ácido graso sintasa (FAS) aumenta la síntesis de malonil-CoA y modula la expresión de péptidos orexigénicos y anorexígenos para reducir la ingesta (Hu et al., 2003). Además, este efecto del malonil-CoA hipotalámico está asociado con un efecto indirecto ya que se ha observado que el aumento de malonil-CoA hipotalámico se asocia con una mayor β -oxidación en tejidos periféricos (Cha et al., 2003). La leptina es capaz de aumentar la concentración de malonil-CoA en hipotálamo reduciendo así la ingesta y aumentando el gasto energético (Wolfgang et al., 2007). A nivel periférico, la leptina también promueve el gasto energético. Así, la leptina aumenta la β -oxidación y reduce la esterificación de los AG en células pancreáticas aisladas (Zhou et al., 1997). Este mismo efecto se ha observado en adipocitos y hepatocitos aislados (Cernokovich et al., 2008). En el tejido adiposo también se ha observado que la leptina activa la lipólisis en adipocitos de ratones *ob/ob* pero no de ratones *db/db* (Frübeck et al., 1998). En el músculo esquelético, la leptina aumenta la β -oxidación por un mecanismo que implica la activación (fosforilación) de la subunidad catalítica α_2 de AMPK (pAMPK) (Minokoshi et al., 2002). También mejora la respuesta a insulina en músculo esquelético al disminuir la acumulación de TG (Dube et al., 2007). En el corazón, la leptina favorece la β -oxidación a través de mecanismos independientes de la activación de AMPK (Atkinson et al., 2002). También reduce la actividad del complejo piruvato deshidrogenasa (PDH) disminuyendo la oxidación del piruvato (Bryson et al., 1999) y aumentando indirectamente la β -oxidación. Igualmente, se ha observado que en ratones *ob/ob* la leptina favorece el crecimiento de los cardiomiocitos (Rajapurohitam et al., 2003).

3.5.- RESISTENCIA A LEPTINA

La obesidad se asocia con un aumento de la concentración de leptina plasmática (hiperleptinemia) y con la aparición de resistencia al efecto de la leptina, que se traduce en una pérdida de los efectos de la misma tanto a nivel central como periférico. La resistencia a leptina se ha relacionado con: i) un paso deficiente de leptina desde la sangre a través del plexo coroideo y/o de la barrera hematoencefálica hasta el hipotálamo (Caro et al., 1996), ii) una desensibilización de los receptores de leptina (El-Haschimi et al., 2000; Ren et al., 2008), o iii) un descenso en la expresión y/o fosforilación de la STAT-3 en respuesta a leptina, que se relaciona con un aumento en la expresión de SOCS-3 (Scarpace et al., 2000).

El efecto de la leptina así como las consecuencias de la hiperleptinemia a nivel cardiaco no se conocen con exactitud. Se ha descrito hiperleptinemia en pacientes obesos con isquemia y disfunción cardiaca (Paolisso et al., 1999, Karmazyn et al., 2007). Por un lado se ha descrito que la hiperleptinemia contribuye al desarrollo de hipertrofia ventricular en individuos con insuficiencia cardiaca y/o hipertensión arterial (Ren et al., 2004; Ren et al., 2008). Sin embargo los ratones aleptinémicos (*ob/ob*) que también presentan hipertrofia ventricular y disfunción cardiaca, mejoran tras la administración de leptina (Minhas et al., 2001; Unger, 2005)

En corazón, la resistencia a leptina se asocia con cardiopatías y disfunción cardiaca. Así, se ha observado que el consumo de dieta HF durante 12 semanas causa disfunción cardiaca en rata por aumento de la presión sistólica y depresión de la función contráctil. Este hecho se ha asociado con una reducción de la expresión del receptor funcional de leptina en los cardiomiocito de dichas ratas (Ren et al., 2008). Otro estudio realizado en rata con obesidad inducida por dieta, registró resultados similares mostrando disfunción del cardiomiocito. Sin embargo en este caso no se detectaron cambios en la expresión de la STAT-3 (Relling et al., 2006).

4.- EL MODELO DE OBESIDAD INDUCIDA POR LA DIETA

Los modelos animales constituyen una herramienta muy útil para el estudio de la obesidad. Tradicionalmente, se han utilizado roedores en los que la obesidad se debe a una alteración genética. Uno de los más utilizados sigue siendo el ratón *ob/ob*, que se caracteriza por una deficiencia en la producción de leptina, lo que le conduce a una obesidad generalizada. Otro modelo muy utilizado es el ratón *db/db* que se caracteriza por carecer de receptor funcional de leptina, lo cual da lugar a hiperleptinemia, obesidad y resistencia a insulina. No obstante, estas modificaciones génicas son poco frecuentes en el hombre, por lo que resultan poco representativos de lo que sucede en la obesidad humana (Boudina and Abel, 2007). Una alternativa al uso de estos animales es el uso de modelos de obesidad inducida por dieta (DIO) que permiten obtener un fenotipo obeso mediante la administración de una dieta rica en grasas durante un determinado periodo de tiempo. El éxito de este modelo está influido por múltiples factores como el sexo, la cepa animal, la edad, la composición de la dieta o el tiempo de administración de la dieta.

De las distintas cepas animales que pueden utilizarse para el desarrollo de DIO, la más utilizada es la cepa de ratón C57BL/6J. Estos animales desarrollan obesidad cuando reciben dietas ricas en grasas y presentan hiperglucemia e hiperinsulinemia, mientras que mantienen su peso cuando consumen dietas bajas en grasas, reflejando con mayor exactitud lo que ocurre en el humano obeso (Rebuffe-Scrive et al., 1993; Surwit et al., 1995; Nishikama et al., 2007). Así, el consumo a corto plazo (2 semanas) de una dieta rica en grasas saturadas en estos ratones recién destetados conlleva el incremento del peso corporal, de los tejidos adiposos y de la secreción de leptina (Van Heek et al., 1997). También es importante conocer el tipo de la grasa presente en la dieta. En rata, el consumo a corto plazo (8 semanas) de grasas saturadas promueve la apoptosis del cardiomiocito al aumentar la síntesis/acumulación de ceramidas en el mismo. Sin embargo, el consumo de grasas insaturadas no es causa de apoptosis del cardiomiocito (Okere et al., 2006). El consumo de estas dietas ricas en grasas (*high fat*, HF) se asocia con la aparición de resistencia a leptina. Así, la administración de leptina reduce la ingesta en roedores alimentados con dieta HF durante 4 días, pero no tiene efecto en roedores alimentados durante 16 días, indicando la aparición de resistencia a leptina (Van Heek et al., 1997). El consumo de estas dietas HF también se ha asociado con la aparición de resistencia a insulina. En ratones C57BL/6J, el consumo a corto plazo (3 semanas) causa resistencia a insulina en hígado, músculo esquelético, corazón y tejido adiposo y se asocia además, con un aumento del contenido graso en músculo esquelético y en hígado (Park et al., 2005).

5.- METABOLISMO CARDIACO

El corazón necesita un elevado aporte energético para llevar a cabo la contracción muscular (60-70%) y para mantener el funcionamiento de las bombas iónicas y de otros procesos celulares (30-40%) (Figura 2). En condiciones normales casi el 95% del ATP procede de la fosforilación oxidativa mitocondrial. Una capacidad oxidativa adecuada permite al corazón mantener un flujo de ATP constante y necesario para hacer frente a situaciones de déficit energético sin necesidad de mantener una reserva de ATP cardiaco (Stanley et al, 2005).

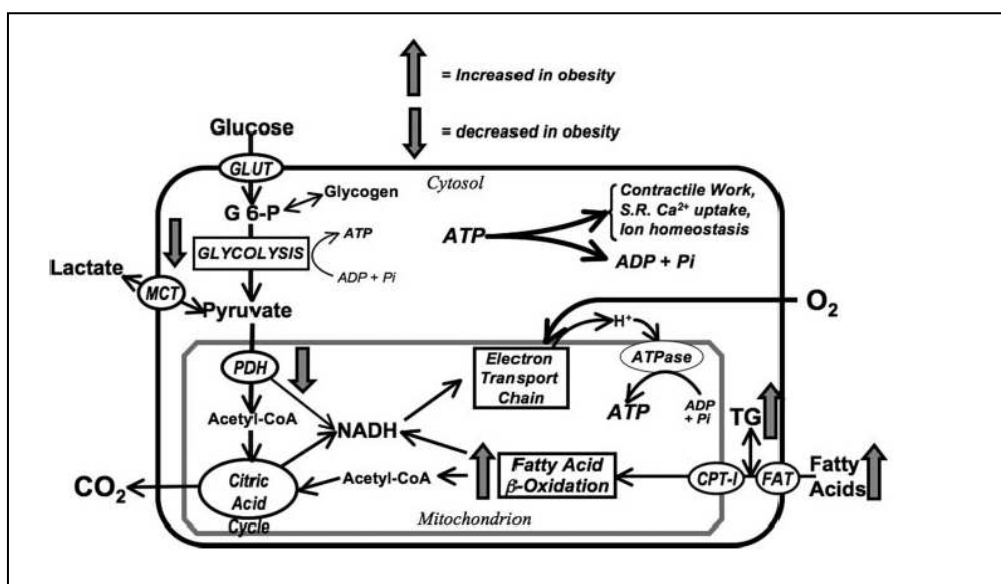


Figura 2. Vías de obtención de energía a partir de los nutrientes ingeridos en la dieta en condiciones normales y en una situación de obesidad en el cardiomiocito. Tomada de Lopaschuk et al., 2007. ATP sintasa (ATPase), ciclo de Krebs (CAT), Carnitin-palmitoil-transferasa (CPT), cadena respiratoria (cte), transportador de ácidos grasos (FAT), glucosa 6-fosfato (G6P), transportador de glucosa (GLUT), transportador de lactato (MCT), piruvato deshidrogenasa (PDH).

En condiciones normales, el corazón obtiene la energía a partir de la oxidación de los AG (60%), de la glucosa y del lactato (40%). Estas proporciones pueden variar en función de la composición de la dieta, de forma que ante una dieta rica en grasa, el corazón puede llegar a obtener hasta el 90% de la energía que necesita casi exclusivamente de la oxidación de AG (Stanley et al, 2005).

5.1.- METABOLISMO DE LOS ÁCIDOS GRASOS

Los AG se encuentran en la sangre formando parte de los TG contenidos en los quilomicrones o en las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Por acción de la lipoproteína lipasa (LPL), localizada en el endotelio capilar, los AG se liberan y penetran en los cardiomiocitos. Su entrada se lleva a cabo por difusión pasiva o a través de transportadores específicos para AG. Existen varios tipos de transportadores de ácidos grasos, que incluyen las proteínas de unión a la membrana plasmática (FABP) y las traslocasas (FAT) como la CD36. Una alteración en la expresión o funcionalidad de dichos transportadores puede contribuir a la acumulación de TG en el corazón y al desarrollo de cardiomiopatías (Van der Vusse et al, 2000; Ouwens et al. 2007). Una vez en el citoplasma, la acil-CoA sintasa (ACS) conjuga los ácidos grasos con el coenzima A, dando lugar a los acil-CoA. Éstos pueden oxidarse en la mitocondria para producir energía o esterificarse y almacenarse en forma de TGs. En condiciones normales mas del 80% de los acil-CoA se oxidan y sólo una pequeña parte se almacena en forma de TG constituyendo así un pequeño reservorio energético (ver revisión Eaton, 2002) (Figura 3).

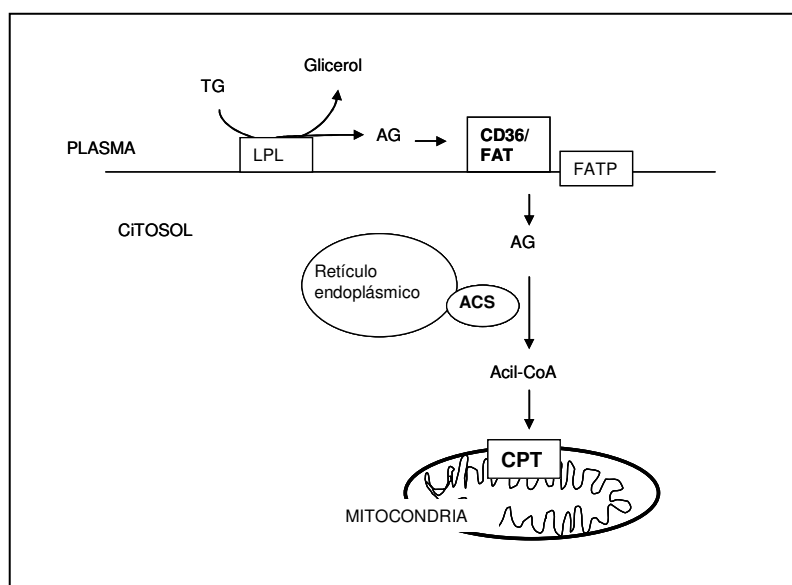


Figura 3. Degradación del triglicérido y entrada de los ácidos grasos desde el plasma al interior del cardiomiocito. Triglicérido (TG), lipoproteín-lipasa (LPL), transportadores de ácidos grasos (CD36, FAT, FATP), ácido graso (AG), acil-CoA-sintasa (ACS), derivado acilo (acil-CoA) carnitina-palmitoiltransferasa (CPT)

Los acil-CoA son captados por la mitocondria a través del complejo carnitin-palmitoiltransferasa (CPT). Dicho complejo está constituido por la CPT-I, localizada en la membrana mitocondrial externa, la carnitin-aciltraslocasa (CACT), y la CPT-II, localizadas en la membrana mitocondrial interna. La CPT-I cataliza la conjugación de los acil-CoA derivados con la carnitina. En esta reacción se libera coenzima A al citosol, que se reutiliza para activar una nueva molécula de AG. La acil-carnitina es sustrato de la CACT, que libera la carnitina permitiendo que el AG se vuelva a conjugar con la coenzima A en acil-CoA, al tiempo que la CPT- II lo introduce en la mitocondria (Figura 4). La actividad de la CPT-I está regulada por el malonil-CoA, que es el precursor de la síntesis *de novo* de AG. El malonil-CoA actúa como inhibidor alostérico de la CPT-I disminuyendo la entrada de AG a la mitocondria y la β -oxidación. La CPT-I se ha convertido en una diana farmacológica potencialmente interesante para el tratamiento de enfermedades asociadas a la obesidad, como la diabetes tipo II y las enfermedades cardiovasculares (Ruderman et al., 1999).

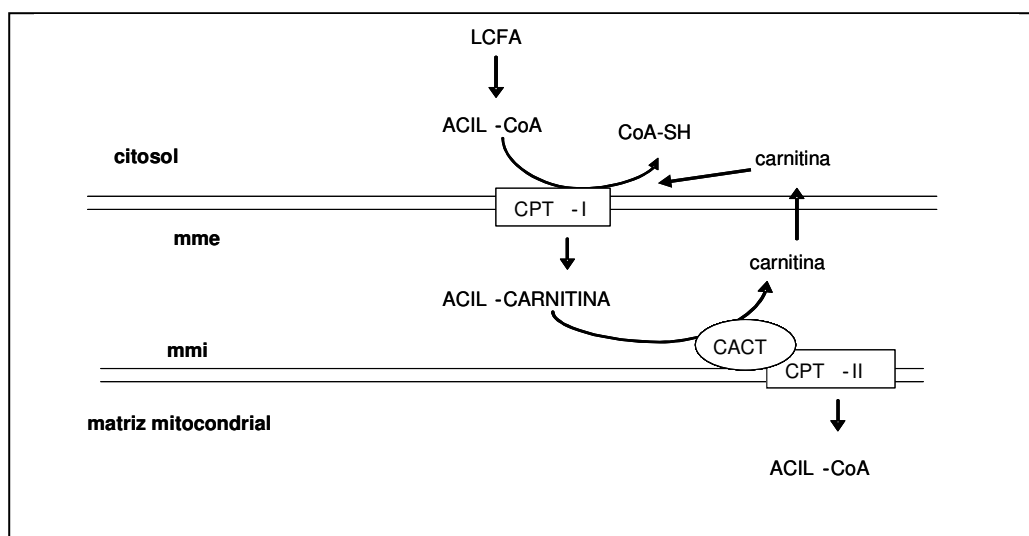


Figura 4. Entrada de los ácidos grasos desde el citosol hasta la mitocondria a través del complejo carnitin-palmitoil transferasa. Ácido graso de cadena larga (LCFA), membrana mitocondrial externa (mme), membrana mitocondrial interna (mmi), carnitina-palmitoiltransferasa-I (CPT-I), carnitin-aciltraslocasa (CACT), carnitina-palmitoiltransferasa-II (CPT-II).

Una vez en la matriz mitocondrial, los acil-CoA se incorporan a la β -oxidación. La β -oxidación es un proceso cíclico que libera una molécula de acetil-CoA por ciclo. El acetil-CoA se transforma en citrato por acción de la citrato sintasa (CS) y se incorpora al ciclo del ácido cítrico o ciclo de Krebs para ser metabolizado y obtener los cofactores nicotinamida-adenin-dinucleótido (NADH) y flavin-adenin-dinucleotido (FADH_2) (Figura 5).

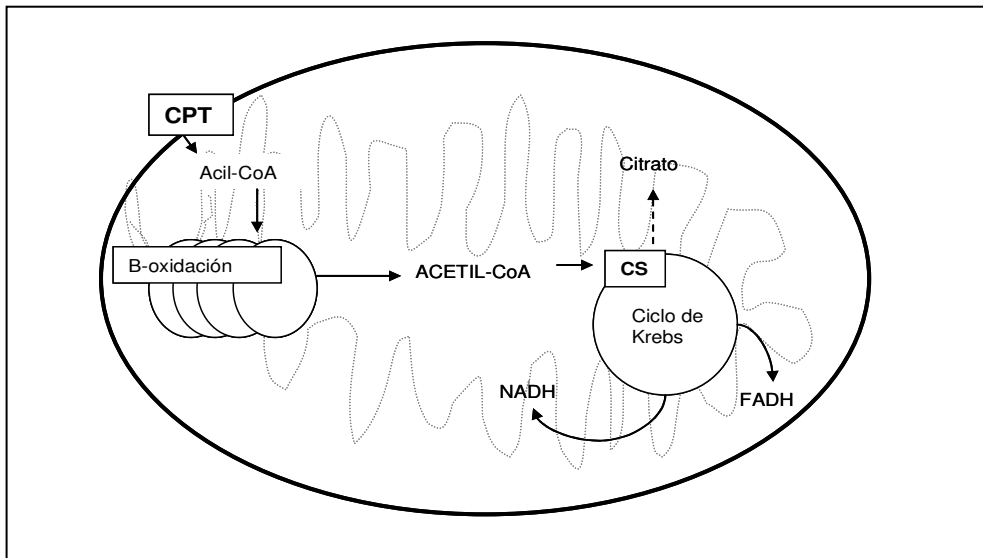


Figura 5. Oxidación de los ácidos grasos en la mitocondria.

Los cofactores NADH y FADH_2 liberan electrones en las distintas subunidades de la cadena electrónica hasta su aceptor final, el oxígeno. El paso de electrones conlleva la salida de protones (H^+) desde el interior de la matriz mitocondrial hacia el citoplasma alterando el gradiente electroquímico. Para restaurarlo, los H^+ regresan al interior de la matriz mitocondrial a través de la bomba ATP-sintasa generando energía suficiente para la síntesis de ATP. Una vez formado, éste saldrá de la mitocondria para ser utilizado por el corazón como fuente energética (Mitchell, 1966) (Figura 6).

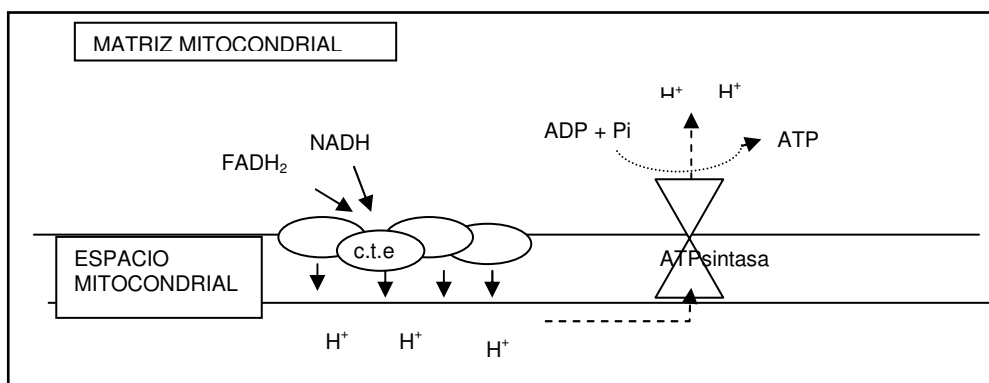


Figura 6. Proceso de fosforilación oxidativa para la obtención de ATP.

Un consumo de grasas prolongado supone una mayor llegada de AG al cardiomiocito y una mayor β -oxidación que genera un incremento de acetil-CoA y de la actividad citrato sintasa (CS). Estos procesos reducen la oxidación de piruvato. El citrato formado en la mitocondria puede ser exportado al citosol e inhibir la fosfofructoquinasa-1, enzima limitante en la glucólisis (Randle, 1998). El citrato también puede transformarse en malonil-CoA e inhibir la CPT-I, restaurando el equilibrio entre la oxidación de AG y piruvato. Igualmente, una excesiva actividad del ciclo del ácido cítrico genera un mayor aporte de electrones hacia la cadena electrónica, que pueden contribuir a la formación de especies reactivas de oxígeno (Liu et al., 2002).

5.2.- METABOLISMO DE LOS HIDRATOS DE CARBONO

5.2.1.- Metabolismo de la glucosa

La glucosa entra en el cardiomiocito a través del transportador GLUT- 4. Una vez en el citoplasma, la glucosa se transforma en glucosa-6-fosfato (G6P) y puede seguir diferentes vías: i) la glucólisis. Por esta vía la glucosa se transforma en piruvato y se oxida en la mitocondria para obtener energía en forma de ATP, ii) la ruta de las pentosas fosfato. En esta ruta la glucosa es transformada en ribosa generando NADPH, necesario para diferentes procesos celulares, y iii) la glucogenogénesis. La glucosa se transforma en glucógeno constituyendo un pequeño reservorio energético al que acceder en situaciones de déficit o deprivación energética.

Glucólisis

La glucólisis es el proceso por el cual la glucosa se transforma en piruvato (Figura 7). El piruvato es susceptible de sufrir oxidación aeróbica o reducirse a lactato en función de la disponibilidad de oxígeno. En condiciones normales, predomina la **oxidación aeróbica**, por la cual el piruvato atraviesa la membrana mitocondrial por acción del complejo piruvato deshidrogenasa (PDH) que lo transforma en acetil-CoA. En este punto el metabolismo del piruvato converge con el de los AG. Esta ruta está regulada principalmente por la acción de la **fosfofructoquinasa 1 (PFK-1) y por la PDH**. La fosfofructoquinasa-1 transforma la fructosa 6-fosfato en fructosa-1,6-bisfosfato. Esta enzima está regulada alostéricamente por la relación ATP/ADP/AMP y por la concentración citosólica de citrato. Un aumento de ADP y AMP activan la enzima mientras que el ATP o el citrato, la inhiben. De este modo, la β -oxidación puede inhibir la oxidación de piruvato al aumentar la concentración de ATP y de citrato (Sudgen and Holness 1994; Randle, 1998) (Figura 7). La piruvato deshidrogenasa permite la entrada de

piruvato a la mitocondria en forma de acil-CoA para ser oxidado y obtener ATP. La regulación de la PDH puede ser por inhibición alostérica por acetyl-CoA y NADH (Sudgen and Holness 1994), o por modificación covalente, mediante fosforilación/defosforilación de la enzima, que difiere en función del tejido estudiado (ver revisión Martin et al, 2005). La carnitin-palmitoiltransferasa también está regulada por acetyl-CoA y NADH, lo que supone una competencia de ambas enzimas, CPT y PDH, por los mismos sustratos. Así el consumo de dietas ricas en grasas aumenta la actividad CPT y reduce la actividad PDH (Randle et al., 1963; Sudgen et al., 1995).

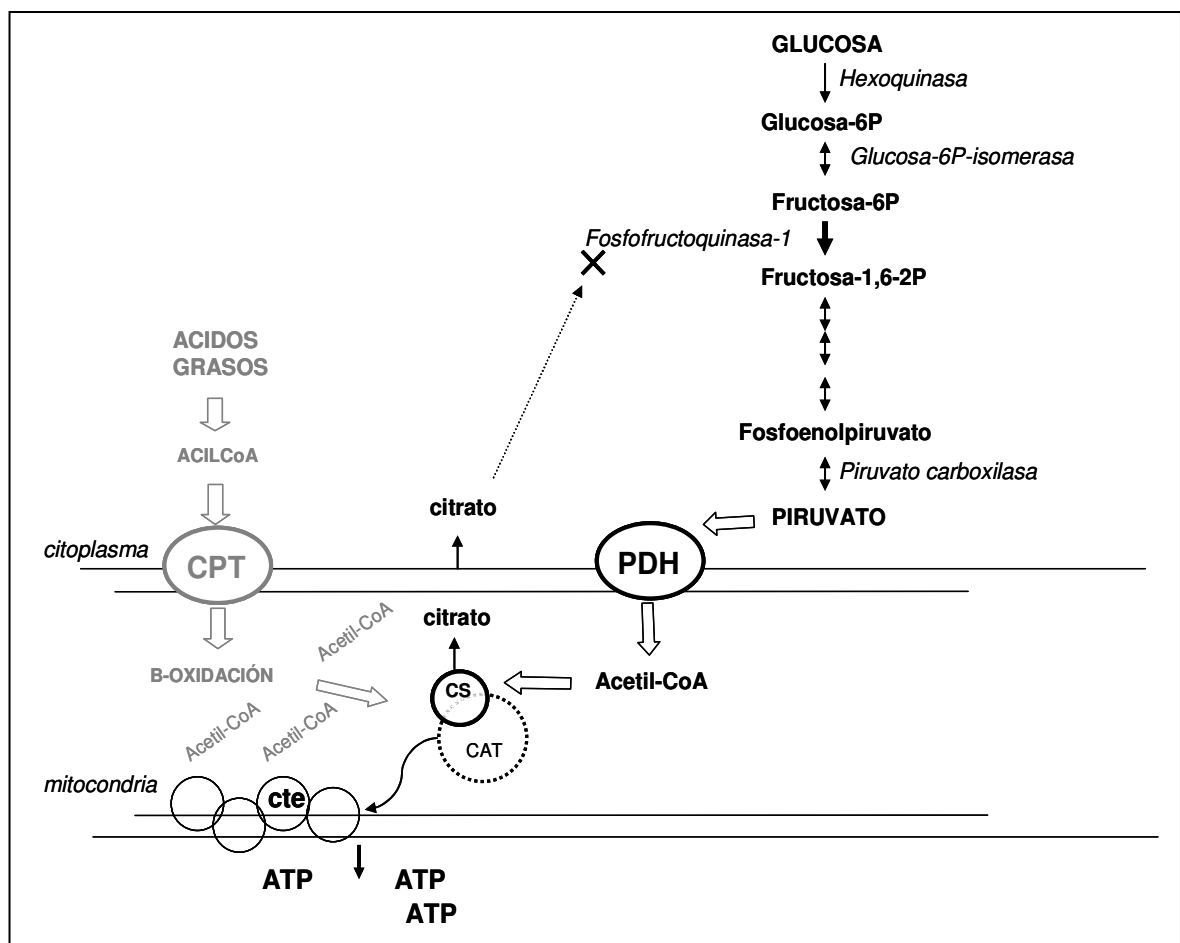


Figura 7. Glucólisis e interacción entre la oxidación ácidos grasos-piruvato. Piruvato deshidrogenasa (PDH), carnitin-palmitoil transferasa (CPT), citrato sintasa (CS), ciclo de Krebs (CAT), cadena electrónica (cte)

Por el contrario, cuando hay un déficit de oxígeno (hipoxia, isquemia) el piruvato no entra en la mitocondria sino que se reduce a lactato por acción de la lactato deshidrogenasa (LDH) (Figura 8).

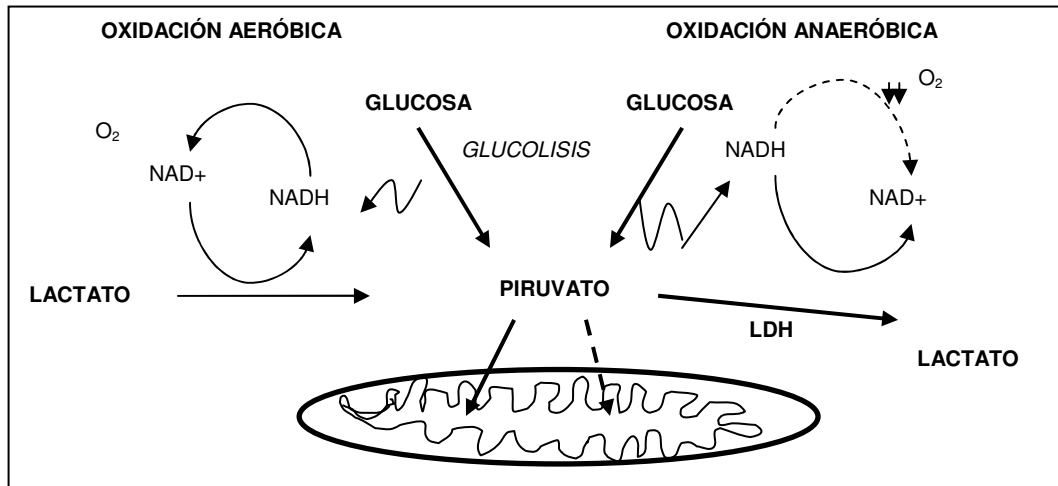


Figura 8. Esquema comparativo entre la oxidación aeróbica y anaeróbica.

Ruta de las pentosas fosfato

La ruta de las pentosas fosfato es una ruta metabólica que está estrechamente relacionada con la glucólisis. Por esta ruta, la glucosa-6-fosfato (G-6P) es utilizada para formar ribosa necesaria para la síntesis de nucleótidos y NADPH.

La glucosa-6-fosfato se transforma en 6-fosfogluconato, por acción de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH). Ésta, a su vez se transforma en 6-fosfogluconato y ribulosa-5-fosfato por acción de la fosfoglucononasa y de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa respectivamente (Figura 9).

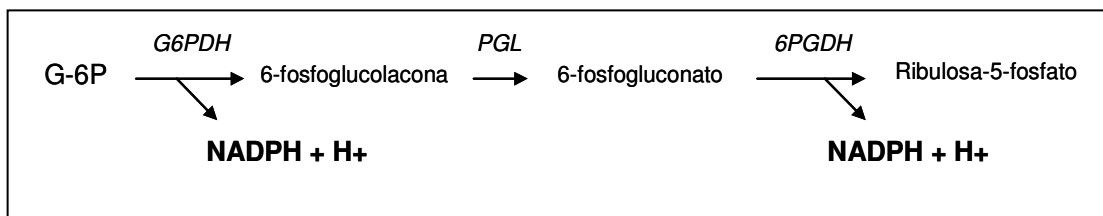


Figura 9. Ruta de las pentosas fosfato. Glucosa-6-fosfato (G-6P), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), fosfoglucononasa (PGL), 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH).

La principal enzima que regula dicho proceso es la G6PDH que se activa con un aumento de NADP^+ y se inhibe con un aumento de NADPH. Esta ruta es muy activa en el tejido adiposo, que requiere una elevada cantidad de NADPH para la síntesis de *novo* de AG. En otros tejidos más oxidativos, como el corazón, el NADPH se utiliza para regenerar glutatión y limitar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Jain et al., 2003; Jain et al., 2004; Gupte et al., 2006). La ausencia de G6PDH se asocia con un deterioro de la contracción cardíaca y con un aumento de la presión diastólica (Jain et al., 2004).

Glucogénesis

La glucogénesis es la síntesis de glucógeno a partir de glucosa (Figura 10). El glucógeno constituye un importante reservorio energético y se almacena principalmente en hígado y músculo esquelético. También se detecta la presencia de glucógeno en otros órganos como cerebro y corazón, pero en pequeñas cantidades. La presencia de glucógeno en corazón parece proteger al mismo del daño asociado a un episodio de isquemia-reperfusión (Ofir et al., 2008). Sin embargo, una acumulación excesiva del mismo se asocia con alteraciones en la conducción cardíaca (Arad et al., 2003; Sidhu et al., 2005).

La síntesis de glucógeno está regulada por la glucógeno sintetasa. La actividad de la enzima depende del estado de fosforilación/defosforilación en el que se encuentre, y puede variar en función de las condiciones y tejido estudiados (Mitchell and Thomas, 1981). Una de las quinasas implicadas en la regulación de la misma es la Akt, que la activa (Valverde et al., 2003). También está regulada de forma alostérica por la presencia de insulina que la activa y el glucagón que la inhibe (Valverde et al., 2003; Jensen and Lai, 2009).

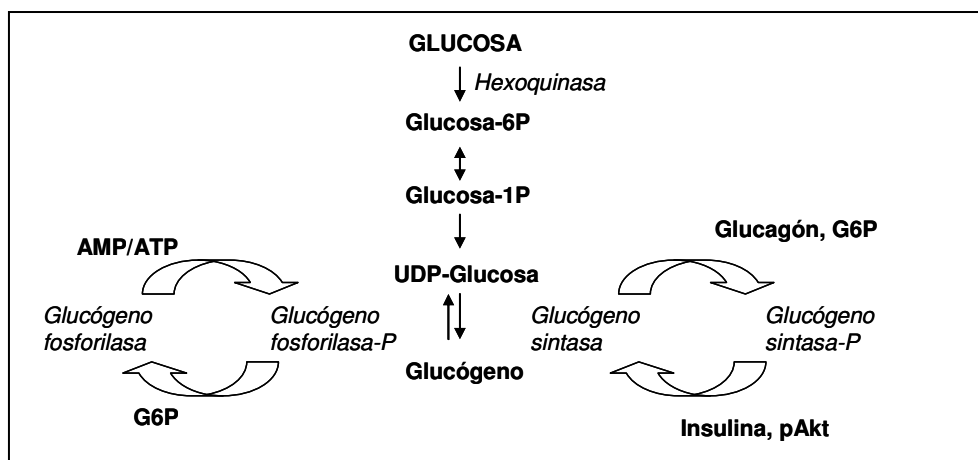


Figura 10. Síntesis y degradación de glucógeno.

5.2.2.- Metabolismo del lactato

El lactato plasmático penetra en el cardiomiocito a través de un transportador específico (MCT, *monocarboxilic acid transporter*) y se transforma en piruvato por acción de la lactato deshidrogenasa (LDH). En este punto el metabolismo del lactato converge con la glucólisis para formar piruvato.

La LDH presenta varias isoformas: la isoforma H (heart type, LDH₁) que favorece la formación de piruvato y requiere la presencia de NAD⁺, y la isoforma M (muscle type, LDH₅), que favorece la formación de lactato y requiere NADH como cofactor (Figura 11). La disponibilidad de sustrato así como de los cofactores necesarios determinará el sentido de la reacción (Mallet, 2000).

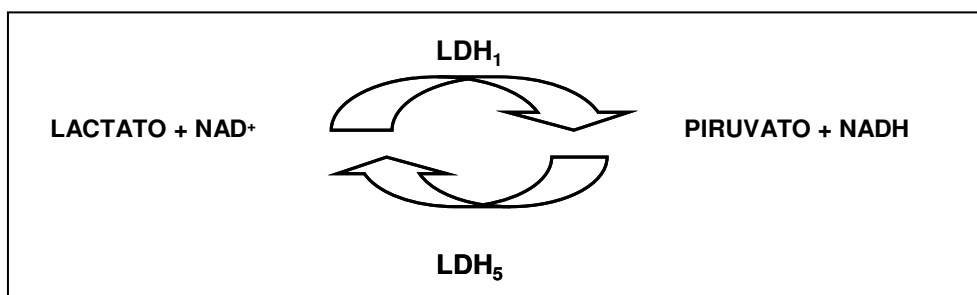


Figura 11. Regulación de la LDH. La regulación de la LDH dependerá de la cantidad de sustrato presente en el cardiomiocito así como de la disposición de oxígeno y de los transportadores electrónicos.

En condiciones aeróbicas el corazón sintetiza piruvato a partir de lactato. Sin embargo, en determinadas situaciones como la hipoxia o la isquemia el corazón puede transformar piruvato en lactato. Si esta situación se prolonga, el lactato puede acumularse en el cardiomiocito provocando acidosis y daño tisular (Lu et al, 2005). El aumento de lactato en corazón también está relacionado con la activación de la NADH-oxidasa, una de las principales fuentes de producción de O₂⁻ (Mohazzab et al., 1997). Por el contrario, la formación de piruvato reduce la actividad NADH-oxidasa y la formación de O₂⁻ (Bossenge et al., 2000). También se ha observado que la acumulación de lactato suprime la glucólisis y fomenta la aparición de resistencia a insulina en tejidos como el músculo esquelético, aunque los mecanismos por los cuales sucede dicha asociación aun no se conocen (Choi et al., 2002).

6.- ADAPTACIONES DEL METABOLISMO CARDIACO

El metabolismo cardiaco depende en gran parte del estatus nutricional (concentraciones plasmáticas de AG, glucosa, lactato y cuerpos cetónicos). Una dieta excesivamente rica en grasas aporta un exceso de energía que mayoritariamente se almacena en el tejido adiposo en forma de TG. No obstante, los tejidos con alta actividad oxidativa, como el miocardio y el músculo esquelético, pueden adaptar su metabolismo y poner en marcha mecanismos que ayuden a captar y utilizar los AG, convirtiéndolos en su principal fuente de energía y evitando su acumulación. Dichos mecanismos son: i) la termogénesis y ii) el incremento de la β -oxidación.

6.1.- LA TERMOGÉNESIS

La termogénesis es el proceso por el cual la energía obtenida de los alimentos se disipa en forma de calor para mantener la temperatura corporal. En 1976 Nicholls descubrió una proteína localizada en la membrana mitocondrial interna, a la que denominó proteína desacoplante (*Uncoupling protein, UCP*). La UCP actúa como un ionóforo que permite la entrada de protones a la mitocondria, reduce el gradiente electroquímico y en consecuencia, limita la formación de ATP (Figura 12). De esta forma la energía generada en la fosforilación oxidativa no se almacena sino que se disipa en forma de calor (desacoplamiento mitocondrial) (Nicholls, 1976).

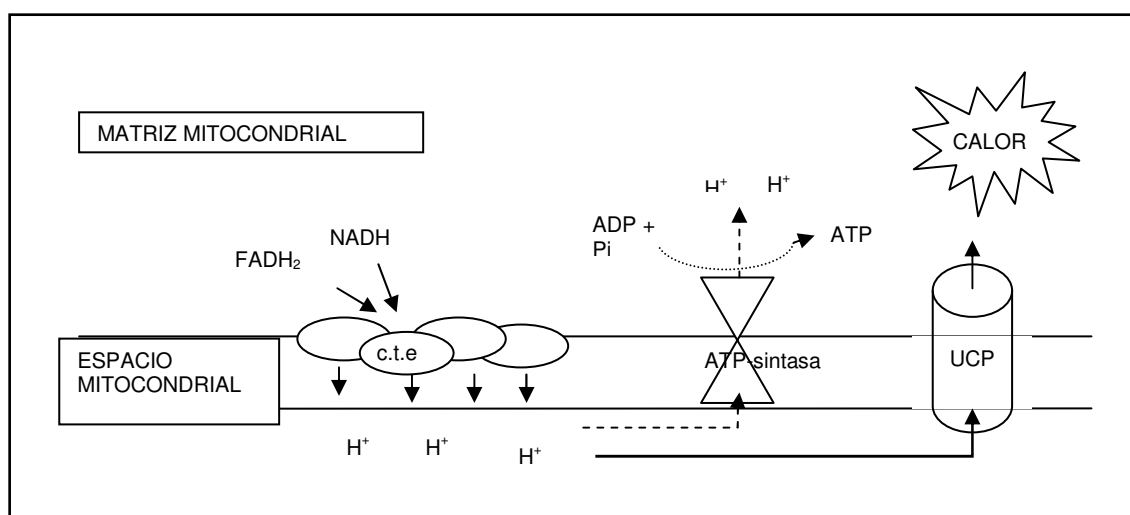


Figura 12. Mecanismo de acción de la UCP. Los protones desvían su paso por la ATP sintasa y entran en la matriz a través de las UCPs. (cte) cadena de transporte electrónico, (Pi) fosfato inorgánico.

La primera UCP que se identificó fue la UCP-1. Dicha proteína se expresa principalmente en tejido adiposo marrón y es la única que ha demostrado tener efecto termogénico (Nicholls, 1976). Posteriores estudios muestran la expresión de UCP-1 en otros tejidos como el corazón (Hoerter et al., 2004). Aunque el desacoplamiento mitocondrial sólo se estudió inicialmente en el tejido adiposo marrón, posteriores estudios evidenciaron que también se producía desacoplamiento en otros tejidos como músculo e hígado, y que era responsable de un 20-30% del consumo de oxígeno total en dichos tejidos, aunque no se detectó un aumento en la producción de calor, como en el tejido adiposo marrón (Brown, 1992). Este hecho puso de manifiesto la existencia de proteínas análogas a UCP-1. Así se identificó la UCP-2, que presenta una homología del 57% con la UCP-1 de roedores y del 59% con la UCP-1 humana. Se localiza en diferentes tejidos como músculo esquelético, páncreas, cerebro, pulmón y corazón (Fleury et al., 1997). La UCP-3, que se expresa principalmente, en el músculo esquelético y el tejido adiposo. Presenta una homología del 54% con la UCP-1 de roedores y del 57% en humanos, mientras que con la UCP-2 la homología aumenta hasta 72% y 73% para roedores y humana (Vidal-Puig et al., 1997)

Las UCPs presentan una estructura similar a las proteínas de transporte de protones y aniones presentes en la membrana mitocondrial interna (Klingenberg y Huang, 1999). Gracias a esta naturaleza se han propuesto dos posibles mecanismos de acción en los cuales juega un papel importante la presencia de los AG: i) la UCP es permeable al paso de protones y en presencia de AG, éstos proporcionan los grupos carboxilo necesarios para el transporte de los protones (Klingenberg and Huang, 1999), y ii) los AG recogen los protones del espacio intermembrana, fluyen hasta la matriz mitocondrial a través de las UCP, donde se deshacen de estos protones, y vuelven al espacio intermembrana de nuevo a través de las UCPs (Garlid et al., 1998).

Una termogénesis baja o deficitaria puede estar relacionada con el desarrollo de obesidad. Numerosos estudios relacionan la mayor/menor expresión de UCPs con una mayor/menor predisposición al desarrollo de obesidad, lo que les confiere un papel en la regulación del metabolismo energético (ver revisiones Boss et al., 2000; Schrauer and Hesselink, 2002 y Ricquier 2005). Así, se observa que roedores con déficit de UCP-1 desarrollan obesidad ya desde estadios muy iniciales (Lowell et al., 1993). Igualmente se ha demostrado que ratones de la cepa A/J, son más capaces a mantener el peso corporal ante el consumo de dietas hipergrasas que los ratones C57, gracias a una mayor expresión de ARNm para UCP-2 en el tejido adiposo (Fleury et al., 1997).

Sin embargo, las UCPs también son capaces de ejercer otros efectos. Así se ha demostrado que la sobreexpresión cardiaca de UCP-1, protege al corazón del daño asociado a la isquemia-reperfusión (Hoerter et al., 2004). Igualmente se ha observado que el corazón de ratas sometidas a isquemia-reperfusión registró un aumento de expresión de UCP-2 y UCP-3 que coincidió con una mejor recuperación de las mismas al daño asociado a dicha isquemia-reperfusión (McLeod et al., 2005). Aunque el mecanismo por el cual se produce esta mejora no se conoce con exactitud, parece estar relacionado con una menor producción de radicales libre (ROS). De hecho, se ha demostrado que un aumento en la expresión de UCP-2 y UCP-3 se asocia con una menor formación de ROS en hepatocitos y en células musculares C2C12 (Nègre-Salvaire et al., 1997; Barreiro et al., 2009).

Su regulación puede variar en función de las condiciones y tejido en el que se estudie. Así, los trabajos de Van der Lee y cols (2000) en miocitos aislados demuestran que los AG, pero no la glucosa, aumentan la expresión del ARNm de estas proteínas. Igualmente, Millet y cols (1997) observaron una correlación positiva entre el índice de masa corporal y los niveles de ARNm de UCP-2, en el tejido adiposo subcutáneo. La edad también parece regular las UCPs, así se detectó un aumento de ARNm de UCP-2 en músculo esquelético e hígado de animales viejos, sin embargo, no se detectó ninguna regulación en el músculo cardiaco. (Barazzoni and Nair, 2001).

6.2.- INCREMENTO DE LA β -OXIDACIÓN

6.2.1.- PROTEINQUINASA DEPENDIENTE DE AMP (AMPK)

La AMPK es considerada el sensor energético del organismo y juega un papel importante en el control del metabolismo energético a nivel central y periférico. A nivel central, la activación de la AMPK se asocia con una disminución de la ingesta y con un aumento del gasto energético (Anderson et al., 2004; Minokoshi et al., 2004; Lee et al., 2005), mientras que a nivel periférico, la activación de la AMPK favorece el metabolismo de AG y de glucosa.

La AMPK es un trímero formado por tres subunidades: una subunidad catalítica (α) y dos subunidades no catalíticas o reguladoras (β y γ). A su vez, estas subunidades contienen diferentes isoformas (α_1 , α_2 , β_1 , β_2 , γ_1 , γ_2 y γ_3) que se expresan de diferente manera en los distintos tejidos y que ejercen funciones diferentes. En el corazón, la

AMPK esta formada por las isoformas α_2 , β_2 , γ_2 e γ_3 (Hardie, 2003). La subunidad α , contiene el sitio de fosforilación en el residuo de treonina (Thr¹⁷²) (pAMPK), clave para su función. La subunidad β contiene sitios de unión para diversos elementos como el glucógeno, mientras que la subunidad γ contiene los sitios de unión para el nucleótido AMP. Existen numerosos estudios que muestran que una mutación en la subunidad γ se asocian con la aparición de una cardiopatía caracterizada por hipertrofia, presencia de acúmulos de glucógeno y alteraciones en la conducción cardíaca, que constituyen el síndrome de Wolf-Parkinson-White (WPW) (Dyck and Lopaschuck, 2006; Dolinski and Dyck, 2006; Arad et al., 2007). La mutación en la subunidad γ hace perder el sitio de unión de AMP a la enzima, resultadno en una activación permanente de la AMPK que hace aumentar en exceso las reservas energéticas incrementando así la formación de glucógeno en el cardiomiocito (Ofir et al., 2008).

La activación de la enzima puede llevarse a cabo tanto de forma alostérica, por unión de nucleótidos de AMP, como por fosforilación de la subunidad α en un residuo de treonina (Thr¹⁷²) o de serina (Ser⁴⁶⁶) (Hardie, 2004). La regulación de la misma dependerá principalmente del cociente AMP/ATP. Así, una disminución del cociente AMP/ATP inhibe la AMPK mientras que un aumento del mismo la activa (Rutter et al., 2003). Los niveles de ATP suelen permanecer constantes gracias al equilibrio existente entre la síntesis e hidrólisis del mismo, por ello, la regulación de la AMPK dependerá más de los cambios detectados en la concentración de AMP (Rutter et al., 2003; Hardie et al., 2003). La leptina también estimula la fosforilación de la AMPK en tejidos como el músculo esquelético, de forma directa e indirecta tras la activación del sistema nervioso simpático (Minokoshi et al., 2002). Este efecto de la leptina se ha observado tras administración aguda y crónica de la misma (Steinberg et al., 2003; Janoská et al., 2008). La adiponectina también puede activar la AMPK en tejidos como el músculo esquelético, el hígado y el tejido adiposo (Ruderman et al., 2003). Por el contrario, altos niveles de insulina, fosfocreatina y glucógeno pueden inhibirla (Hardie et al., 2004; Fediuc et al., 2008).

Una de las principales funciones de la AMPK es favorecer la β -oxidación. Para ello la forma activa de la AMPK (pAMPK), fosforila la acetil-CoA carboxilasa (ACC) en el residuo serina (Ser⁷⁹) y la inhibe. Así, disminuye la síntesis de malonil-CoA e incrementa la actividad CPT-I y la β -oxidación (Kudo et al., 1995) (Figura 13). Además la activación de la AMPK (pAMPK) favorece la traslocación del transportador de ácidos grasos CD36 desde el espacio intracelular a la membrana plasmática aumentando la entrada de los mismos (ver revisión Dolinski and Dyck, 2006).

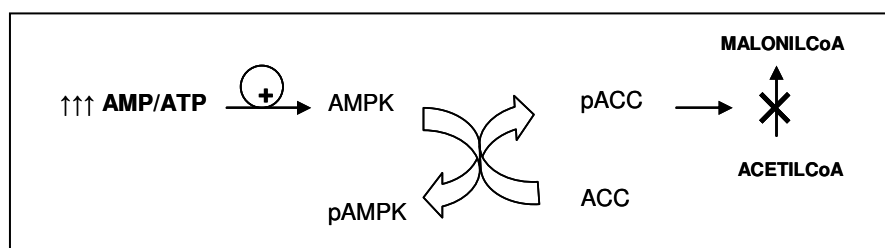


Figura 13. Regulación de la síntesis de malonil-CoA por activación de la AMPK

Respecto al metabolismo de los hidratos de carbono, la fosforilación de la AMPK: i) favorece la traslocación del transportador GLUT-4 desde el espacio intracelular a la membrana plasmática para favorecer la captación de glucosa (Li et al., 2004), ii) estimula la glucólisis de forma directa por activar las fosfofructoquinasa-1 (Marsin et al., 2000) y iii) inhibe la acción de la glucógeno sintasa impidiendo la acumulación de glucógeno (Wojtaszewski et al., 2002; Arad et al 2002). No obstante, el efecto de la pAMPK sobre el metabolismo glucídico sólo parece manifestarse en situaciones de estrés, isquemia o hipertrofia cardiaca (Arad et al., 2007).

6.2.2.- COMPLEJO CARNITIN-PALMITOILTRANSFERASA

La actividad del complejo CPT se considera un paso clave en el metabolismo de los AG ya que controla la entrada de los mismos a la mitocondria. Por ello, su regulación también se considera fundamental para el estudio del metabolismo cardiaco. Como se comentó anteriormente, el principal inhibidor del complejo es el malonil-CoA. Éste es capaz de inhibir la acción de CPT-I y carece de actividad sobre la CPT-II. Debido a dicho efecto es posible distinguir entre la actividad CPT sensible a malonil-CoA, equivalente a la actividad CPT-I y la actividad CPT no sensible a malonil o CPT-II.

La síntesis de malonil-CoA se activa cuando aumenta la concentración citosólica de citrato liberado desde la mitocondria. El citrato citosólico es convertido en acetil-CoA por acción de la citrato liasa (CL). El acetil-CoA es sustrato de la acetil-CoA carboxilasa (ACC) que lo transforma en malonil-CoA. Una vez en el citoplasma, el malonil-CoA puede inhibir la acción de CPT-I y ser precursor de la síntesis de AG (Figura 14). De esta forma, el malonil-CoA ocupa un lugar central en el metabolismo de los AG, actuando como precursor de su síntesis y como inhibidor de su catabolismo.

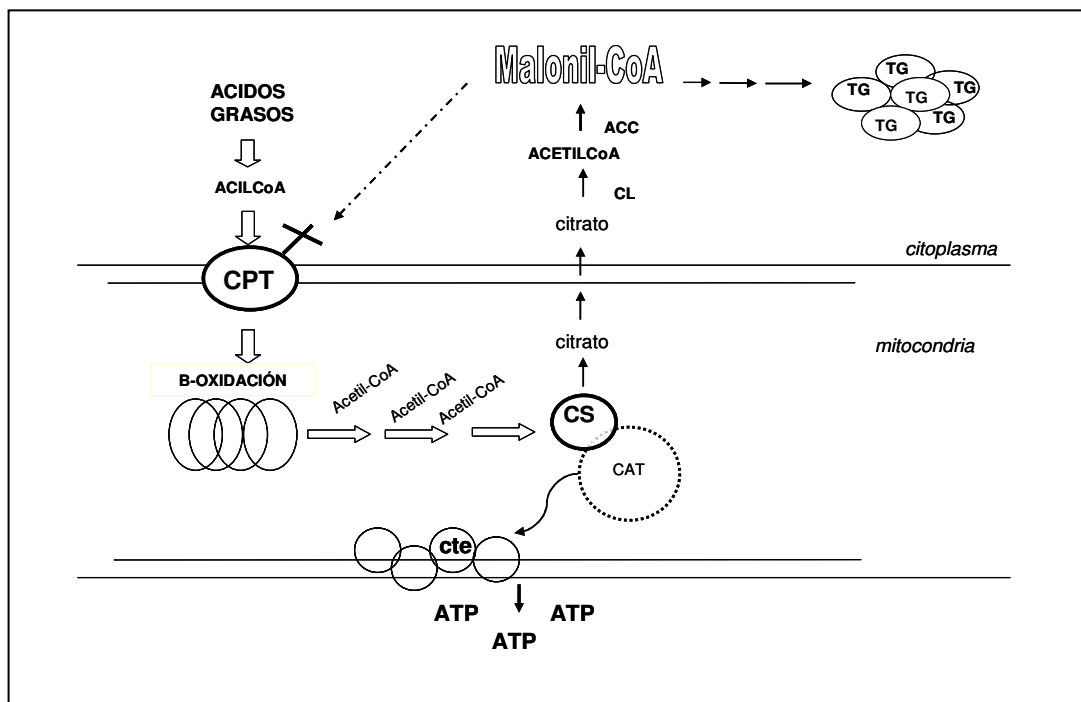


Figura 14. Síntesis de malonil-CoA y funciones del mismo. Carnitin-palmitoil transferasa (CPT), citrato sintasa (CS), ciclo de Krebs (CAT), cadena de transporte electrónica (cte), citrato liasa (CL), acetil-CoA carboxilasa (ACC), triglicérido (TG).

La concentración de malonil-CoA va ligada al estado nutricional del organismo y está regulada por el balance AMPK/ACC. Así, en situaciones de déficit energético, cuando la relación AMP/ATP es elevada, la AMPK se activa mediante fosforilación en un residuo de treonina (pAMPK-Thr¹⁷²), fosforilando la ACC en un residuo de serina (pACC-Ser⁷⁹) e inactivando a la enzima. Como consecuencia, se reduce la formación de malonil-CoA y se favorece la β -oxidación. En estas condiciones, la oxidación de piruvato disminuye (Sudgen and Holness, 1994) y los AG pueden llegar a constituir casi la única fuente de producción de ATP en el corazón. Por el contrario, cuando las necesidades energéticas están cubiertas y aumenta la concentración de ATP, la AMPK se defosforila, la ACC se defosforila y se estimula la síntesis de malonil-CoA (Ruderman et al., 1999) que inhibe la β -oxidación (ver figura 13).

Sin embargo, cada vez son más los estudios que muestran mecanismos de regulación independientes de las concentraciones de malonil-CoA. El mejor caracterizado es la fosforilación de la Tyr²⁸¹ en la isoforma hepática de la CPT-I (Kerner et al., 2004; Distler et al., 2009). Esta fosforilación provocaría un cambio conformacional en la enzima que afectaría al sitio de unión del malonil-CoA reduciéndose su sensibilidad al mismo

(Kerner et al., 2004). Por otro lado, la AMPK también parece modular la actividad CPT-I a través de la fosforilación de componentes del citoesqueleto (Velasco et al., 1998). La activación de la Akt puede suponer otro punto de control de CPT por su acción indirecta sobre la AMPK, ya que la activación de la Akt reduce la activación de la AMPK (Kovacic et al., 2003). También se ha visto que el tipo de dieta ingerida puede regular la actividad CPT. El estudio realizado por Power y Newsholme (1997) demuestra que la dieta grasa es capaz de modificar la sensibilidad de la CPT-I a malonil-CoA ya que modifica la composición de la membrana plasmática alterando el anclaje de la enzima a la misma y reduciendo la sensibilidad por malonil-CoA.

7.- CONSECUENCIAS DERIVADAS DEL EXCESO DE β -OXIDACIÓN

7.1.- FORMACIÓN DE RADICALES LIBRES

Uno de los principales lugares de formación de radicales libres es la cadena respiratoria. Una continua estimulación de la fosforilación oxidativa aumenta el flujo de electrones que pasan a través de la cadena respiratoria favoreciendo la liberación de los mismos y aumentando la formación del radical superóxido (Liu et al., 2002).

Otra fuente importante de formación de radicales libres es la enzima NADPH-oxidasa. Esta enzima está formada por varias subunidades que se encuentran distribuidas entre el citoplasma y la membrana plasmática (forma inactiva) y que deben de ser trasladadas desde el citosol a la membrana plasmática para que tenga lugar su ensamblaje y se forme el complejo funcional (DeLeo and Quinn, 1996). La NADPH-oxidasa cataliza la transferencia de un electrón desde el NADPH hacia el O_2 con la formación de radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). El aumento de NADPH oxidasa se asocia a disfunción endotelial, disfunción cardíaca e insuficiencia cardíaca (Coyle et al., 2006; Gupte et al., 2006, Witting et al., 2007; Serpillon et al., 2009)

El organismo cuenta con sistemas de defensa capaces de reducir la formación de dichos radicales libres. Uno de estos sistemas lo constituyen las enzimas antioxidantes que se encuentran en el interior de la mitocondria, como la manganeso superóxido dismutasa (MnSOD); y en el citosol, como la cobre-zinc superóxido dismutasa (Cu/ZnSOD) y la catalasa. Estas enzimas transforman el $O_2^{\cdot-}$ en formas menos reactivas y dañinas para la célula (Figura 15).

También se ha especulado sobre el papel de las proteínas desacoplantes, en especial UCP-3, como mecanismo de defensa frente a radicales libres. En músculo esquelético, la sobreexpresión de UCP-3 reduce la producción mitocondrial de anión superóxido (Talbot and Brand, 2005). Además se ha descrito un aumento de su expresión en situaciones de estrés lipídico que se producen cuando la captación de AG excede la capacidad oxidativa de la mitocondria (Nabben et al., 2008). Estos resultados sugieren que la UCP-3 protege al corazón ante una situación de estrés, aunque los mecanismos por los cuales lleva a cabo dicho efecto aun no se conocen con exactitud.

Otro sistema de defensa lo constituye el glutatión. El glutatión se encuentra presente en la célula manteniendo un equilibrio entre su forma reducida (GSH) y su forma oxidada (GSSG) gracias a la presencia de NADPH procedente de la ruta de las pentosas fosfato. El glutatión reducido (GSH) es capaz de transformar el peróxido de hidrógeno en agua a través de la acción de la glutatión reductasa. Como consecuencia se obtiene glutatión oxidado (GSSG) que es nuevamente reducido en presencia de NADPH (figura 14). El déficit de GSH está relacionado con un aumento de estrés oxidativo, apoptosis, alteración de la estructura cardíaca y disfunción contráctil (Guo et al., 2009).

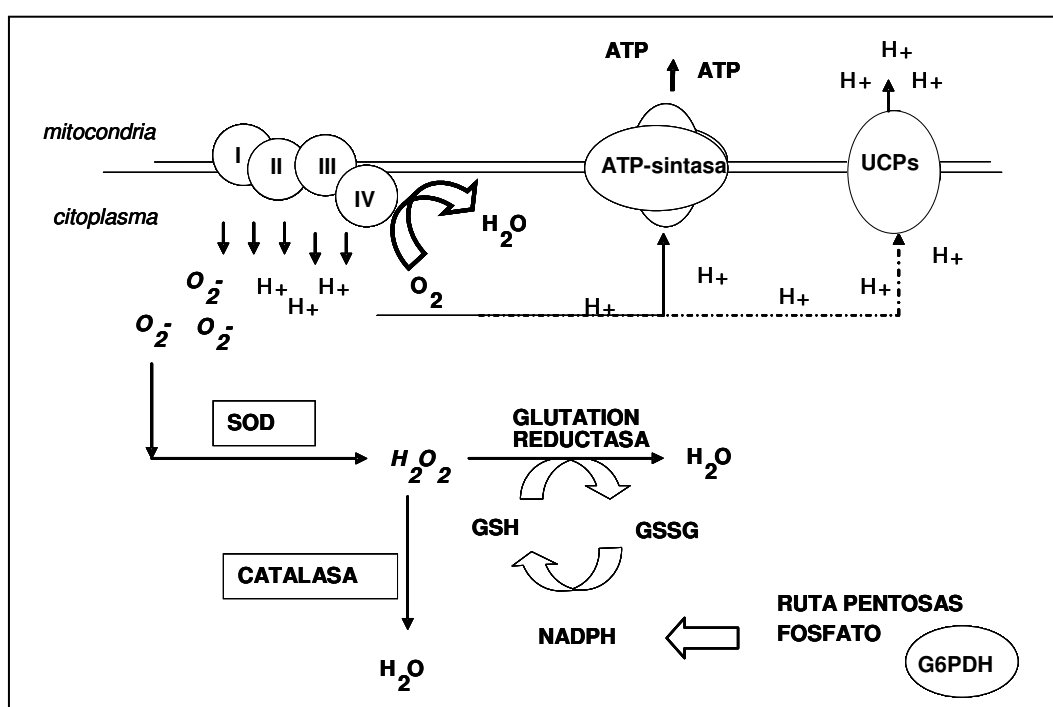


Figura 15. Formación de radicales libres y mecanismos de defensa del organismo. SOD, superóxido dismutasa, GSH glutatión reducido, GSSG, glutatión oxidado, O_2^- , radical superóxido, H_2O_2 , peróxido de hidrógeno, G6PDH, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

7.2- DAÑO MITOCONDRIAL

Las mitocondrias tienen un papel clave en el metabolismo energético de la mayoría de los tejidos incluyendo el músculo esquelético, el hígado o el corazón. El consumo de dietas ricas en grasas aumenta la capacidad oxidativa incrementando la actividad de enzimas como la carnitina-palmitoiltransferasa y la citrato sintasa, para prevenir la esteatosis cardiaca (Chess et al., 2009). Sin embargo, una sobreestimulación prolongada de dichas actividades puede comprometer la producción de ATP, aumentar la formación de radicales libres y favorecer la disfunción mitocondrial, relacionada a su vez con la aparición de alteraciones metabólicas como la obesidad o la resistencia a insulina (Liu et al., 2002; Chanseume et al., 2006).

En músculo esquelético la disfunción mitocondrial conlleva un descenso de la capacidad oxidativa del mismo y un aumento de grasa intramuscular que favorece la aparición de resistencia a insulina (Befroy et al., 2007; Bonnard et al., 2008). En corazón, la reducción del contenido mitocondrial se asocia con alteraciones en la contracción cardiaca (Dong et al., 2007). En hígado, el descenso de la densidad mitocondrial se asocia con una reducción de la capacidad oxidativa y con la aparición de esteatosis hepática (Crescenzo et al., 2008).

Todos estos resultados evidencian la importancia de la integridad y funcionalidad de las mitocondrias. Sin embargo, aún no está del todo esclarecido que la disfunción mitocondrial sea causa o consecuencia de la aparición de dichos desórdenes metabólicos (Johannsen et al., 2009).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El tejido adiposo almacena el exceso de grasa procedente de la dieta. El consumo prolongado de una dieta rica en grasas puede saturar la capacidad del tejido adiposo para almacenar triglicéridos y dar lugar a su acumulación en otros tejidos (Unger, 2003). El tejido adiposo también es un órgano endocrino que sintetiza y libera mediadores conocidos como adipoquinas, entre las que se encuentran la leptina. Esta hormona reduce la ingesta y aumenta el gasto energético actuando por un mecanismo central y periférico. Los receptores centrales de leptina se encuentran en neuronas hipotalámicas que regulan la actividad simpática. En la periferia, los receptores de leptina regulan la β -oxidación. Mediante estos dos mecanismos, la leptina impide que se acumulen lípidos en tejidos no adiposos (Friedman and Haalas, 1998). Se considera que niveles adecuados de leptina en sangre, así como una respuesta correcta de la hormona, previenen la esteatosis y los fenómenos de lipotoxicidad y lipoapoptosis (Unger 2005).

El corazón consume principalmente ácidos grasos como fuente de energía. No obstante, el consumo prolongado de dietas ricas en grasas puede forzar el metabolismo cardiaco incrementando la oxidación de ácidos grasos en detrimento de los hidratos de carbono. Esto conlleva un incremento del consumo de oxígeno y de la producción de radicales superóxido, directamente relacionados con la aparición de cardiomiopatías (Serpillon et al., 2009). En este contexto, nuestra hipótesis es que la hiperleptinemia derivada de una dieta rica en grasa forma parte de los mecanismos adaptativos necesarios para que el organismo limite la esteatosis y los daños derivados de la misma. Para ello, hemos utilizado un modelo animal de obesidad inducida por dieta (modelo DIO) y hemos analizado las adaptaciones y alteraciones metabólicas cardiacas que se producen en dicho modelo DIO. Los objetivos planteados son:

- 1- Caracterizar el modelo DIO en estadios iniciales y más avanzados
- 2- Estudiar las adaptaciones metabólicas en corazón en estadios tempranos de DIO
- 3- Estudiar las adaptaciones/alteraciones metabólicas en corazón en estadios tardíos de DIO
- 4- Estudiar el posible papel cardioprotector de la leptina

MATERIAL Y MÉTODOS

1.- Animales de experimentación

Los experimentos se realizaron en ratones macho de la cepa C57BL/6J de 3 semanas de edad (CRIFA, Barcelona, España), con un peso comprendido entre 16-19 g, que fueron estabulados en condiciones controladas de luz (8:00-20:00h) y oscuridad (20:00-8:00h), temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) y humedad (45-50%), con acceso libre a agua y comida (RMN, Harlan Interfauna Ibérica, España), cumpliendo con la legislación española para el uso de animales de experimentación (RD 1205/2005) y con la guía del buen uso de animales de laboratorio (*"Guide for the Care and Use of Laboratory Animals"*, publicado por el *"US National Institute of Health"*, NIH publicación número 85-23, revisado en 1996).

2.- Tratamientos

Tratamiento dietético

Después de una semana de aclimatación, los animales se dividieron aleatoriamente en dos grupos y se les asignaron diferentes tipos de dieta. El grupo control recibió una dieta que aporta un 10% de kcal procedentes de grasa de sebo (dieta control o *low fat*, LF. 70% hidratos de carbono y 15% proteínas; 3,85 Kcal/g totales; D12450B, Reseach Diets, USA). El grupo experimental recibió una dieta rica en grasa que aporta un 45% kcal procedentes de grasa de sebo (dieta *high fat*, HF. 35% hidratos de carbono y 15% proteínas; 4,73 kcal/g totales; D12451, Reseach Diets, USA). El tiempo de tratamiento fue de 4, 8, 16 y 32 semanas.

Tratamientos farmacológicos

Para realizar los ensayos de resistencia a leptina y de actividad del complejo carnitin-palmitoiltransferasa (CPT), los animales LF y HF se dividieron en dos subgrupos. Uno de ellos recibió una dosis aguda de leptina recombinante de ratón (1 mg/kg), vía intraperitoneal (i.p.) 1 hora antes del sacrificio y el otro grupo recibió un volumen idéntico de suero fisiológico.

La solución de leptina se preparó disolviendo 1 mg de leptina (SIGMA, St Louis, CA) en 15 mM HCl (0.5 ml) y 7.5 mM NaOH (0.3 ml), pH=5.2. A esta solución se añadieron 9 ml de suero fisiológico. La concentración final de leptina fue de 0.1 mg/ml.

Para el tratamiento con triciribina (TCB, inhibidor de la fosforilación de la proteína quinasa B, Akt) los animales del grupo LF se dividieron en dos grupos, uno recibió 1 mg/kg TCB, y el otro suero fisiológico. Al cabo de 30 min, los grupos se subdividieron de nuevo en dos, uno de ellos recibió una dosis de leptina (1 mg/kg, i.p.) y el otro

suero fisiológico, obteniéndose cuatro grupos experimentales: i) salino+salino, ii) TCB+salino, iii) salino+leptina y iv) TCB+leptina.

La solución de TCB se preparó disolviendo 1 mg de TCB (SIGMA, St Louis, CA) en 200 μ l de dimetilsulfóxido (DMSO) y 800 μ l de agua destilada. A esta solución se añadieron 9 ml de suero fisiológico. La concentración final de TCB fue de 0.1 mg/ml.

Para realizar los experimentos en explantes de corazón, se diseccionaron 10 mg de tejido del ventrículo izquierdo que se incubaron en un medio oxigenado (95% O₂ y 5% de CO₂) con Krebs-Henseleit, en placas de 12 pocillos. La mitad de los pocillos se incubaron con 10 μ g/ml de leptina, y la otra mitad con suero fisiológico. La placa se mantuvo a 37°C durante 1h en estufa. Transcurrido este tiempo los explantes se recogieron y se procesaron para extraer mitocondrias.

3.- Control de peso y de ingesta

Durante todo el tiempo de tratamiento, los animales y la comida se pesaron dos veces por semana, para controlar la ganancia de peso y la ingesta.

El peso relativo de los animales se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$[(\text{peso tejido}/\text{peso corporal})] \times 100$$

El porcentaje de variación del peso relativo se calculó aplicando la siguiente fórmula: $[(\text{peso relativo tejido HF}/\text{peso relativo tejido LF})] - 100$

La eficiencia calórica se calculó para cada uno de los animales, estableciendo la relación entre el aumento de peso y las kcal ingeridas por semana.

4.- Obtención de las muestras

El último día de cada uno de los periodos establecidos de dieta, los animales fueron sacrificados por decapitación entre las 9:00 h y las 10:00 h de la mañana. Los tejidos fueron diseccionados, pesados y almacenados a -80°C hasta su utilización. La sangre se recogió en tubos de polipropileno tapizados con EDTA (microvette, Sarstedt, Alemania) y se centrifugó a 4°C durante 20 min a 4000 rpm (Centrifuge 5810, Eppendorf Iberica, España). El plasma se guardó a -20°C hasta su utilización.

5.- Determinaciones bioquímicas en plasma

Todas las determinaciones plasmáticas se llevaron a cabo en animales no ayunados y sacrificados entre las 9:00h y las 10:00h de la mañana.

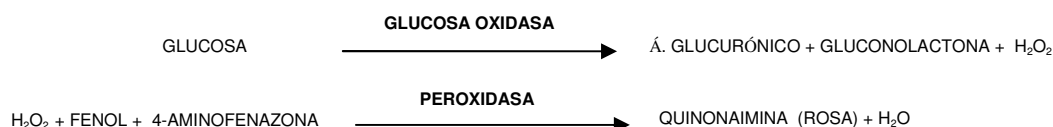
5.1.- Determinación de insulina

La concentración de insulina se determinó mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA) específico para insulina de ratón (Mercodia, Dinamarca). El porcentaje de variación intraensayo e interensayo fue del 2.2% y del 4.9%, respectivamente. Dicho ensayo está basado en la técnica del *sandwich* directa. Se utiliza un anticuerpo monoclonal anti-insulina, que se une a antígenos específicos de la molécula de insulina. Posteriormente, se hace reaccionar el complejo con otro anticuerpo monoclonal anti-insulina marcado con peroxidasa. Por último, se añade un sustrato del enzima que genera un metabolito coloreado. La aparición de color es proporcional a la concentración de insulina en la muestra.

El ensayo se realizó en una placa de 96 pocillos (Greiner bio-one, Alemania), tapizada previamente con un anticuerpo monoclonal anti-insulina de ratón. En cada pocillo se añadieron 25 μ l de plasma y 50 μ l de la disolución de enzima conjugada (anticuerpo monoclonal anti-insulina conjugado con peroxidasa). La placa se incubó 2 h en agitación (IKA@KS 130 basic, Irlanda) a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se lavó 6 veces con la disolución de lavado. Posteriormente se añadieron 200 μ l/pocillo del sustrato TBM (3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina) y se volvió a incubar la placa 15min a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 50 μ l/pocillo de 0,5 M H_2SO_4 . La absorbancia se midió en un lector de placas (Versa-Max, Molecular Devices, USA) a 450 nm. Para cuantificar la variación de color se utilizó una curva patrón obtenida a partir de concentraciones de insulina conocidas (0,2; 0,5; 1,5; 3; 6,5 μ g/ml).

5.2.- Determinación de glucosa

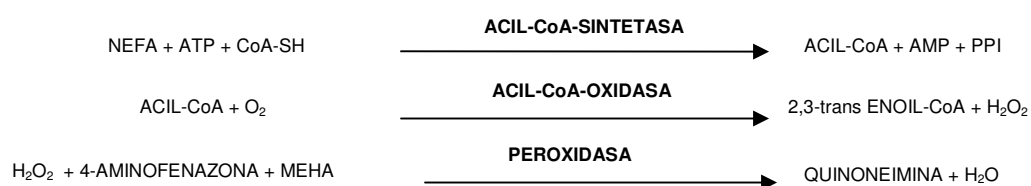
La concentración de glucosa se midió mediante un método enzimático colorimétrico (Glucose Trinder Method, Biolabo, Francia). El método está basado en la oxidación de glucosa a ácido glucurónico y peróxido de hidrógeno en presencia de glucosa-oxidasa. El peróxido de hidrógeno formado reacciona con fenol y con 4-aminofenazona, que en presencia de peroxidasa genera un compuesto de coloración rosa. La aparición de color es proporcional a la concentración de glucosa en la muestra.



El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos. Se utilizaron 10 μl de plasma/pocillo que reaccionaron con 250 μl de reactivo (100 mmol/l tampón fosfato; 0,7 mmol/l 4-aminofenazona; 20000 UI/l glucosa oxidasa; 1000 UI/l peroxidasa; 10 mmol/l clorofenol). La placa se incubó 10 min a 37°C y la absorbancia se determinó a 492 nm en un lector de placas. Para cuantificar la aparición de color se utilizó un estándar de concentración conocida (100 mg/dl o 5.55 mmol/l) y la concentración de glucosa se estableció en función a dicha relación.

5.3.- Determinación de ácidos grasos libres no esterificados

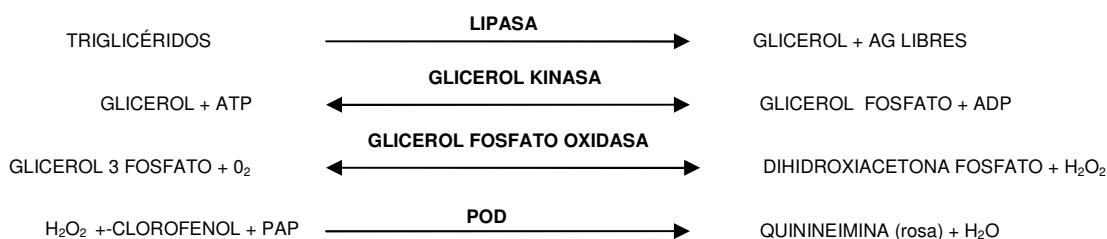
La determinación de ácidos grasos libres no esterificados (NEFAs) se determinó mediante un kit comercial (ACS-ACOD; Wako, Alemania). La acil-CoA sintetasa está implicada en la formación de acil-CoA a partir de NEFA. Los acil-CoA se oxidan por acción de la acil-CoA oxidasa generando peróxido de hidrogeno. Éste reacciona con la 4-aminofenazona en presencia de peroxidasa generando un compuesto coloreado cuantificable a 550 nm. La absorbancia del complejo es proporcional a la cantidad de NEFAs presentes en la muestra.



El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos. Se utilizaron 10 μl /pocillo de muestra y 100 μl /pocillo del reactivo A (0.3 kU/l acil-CoA-sintetasa; 3 kU/l ascorbato oxidasa; 0,6 g/l coenzima A; 5 mmol/l TP; 1.5 mmol/l 4-aminofenazona; 50 mmol/l tampón fosfato, pH=6,9; 3 mmol/l MgCl_2). La mezcla se incubó 10 min a 37°C. Posteriormente se añadieron 200 μl /pocillo del reactivo B (6.6 kU/l AcilCoA oxidasa; 7.5 kU/l peroxidasa; 1.2 mmol/l MEHA (3-metil-N-etil-N-(hidroxi-etil)-anilina) y se incubó durante 10 min a 37°C. Pasado este tiempo se determinó la absorbancia a 550 nm en un lector de placas. Para cuantificar la aparición de color se utilizó una curva estándar obtenida con soluciones patrón de ácido oleico (0, 0.25, 0.5 y 1 M) en NaCl al 0.9%.

5.4.- Determinación de triglicéridos

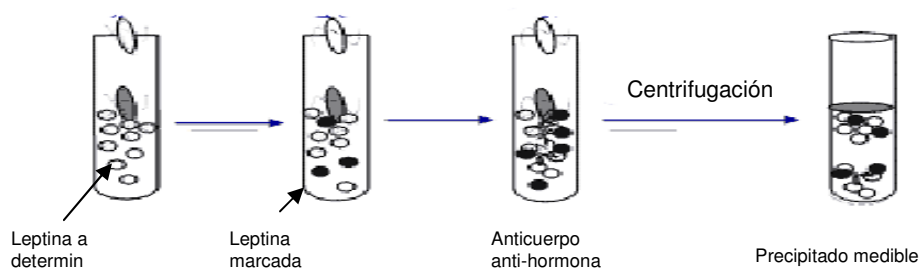
La determinación de triglicéridos (TGs) se llevó a cabo mediante un kit de diagnóstico (Biolabo, Francia) basado en el método de Fossati, Prencipe y Trinder (Fossati, Prencipe, 1982; Trinder 1969), por el cual los TG forman un producto coloreado (quinoneimina), cuantificable a 500 nm. La absorbancia de dicho producto es proporcional a la concentración de TGs presentes en la muestra.



El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos. Las muestras (10 µl/pocillo) se diluyeron en 200 µl de tampón de trabajo (100 mM PIPES, 9.8 mM MgCl₂, 3.5 mM 4-clorofenol, 1000 U/l lipasa, 1700 U/l peroxidasa, 3000 U/l glicerol-3-fosfato oxidasa, 660 U/l glicerol kinasa, 0.5 mM 4-aminoantipirina, 1.3 mM adenosintrifosfato sódico). La placa se incubó 10 min a 25°C, seguidamente se determinó la absorbancia a 500 nm en un lector de placas. Para cuantificar la aparición de color se utilizó un estándar de concentración conocida (200 mg/dl, 2.28 mM) y la concentración de TGs se estableció en base a dicha relación.

5.5.- Determinación de leptina

La determinación de leptina en plasma se hizo por radioinmunoensayo (RIA) específico para leptina de ratón, utilizando un kit comercial (Linco Research, USA). El porcentaje de variación intra e interensayo fue del 4.9% y del 3.3%, respectivamente. Este ensayo se basa en la competencia que se establece entre la leptina presente en la muestra y la leptina marcada con yodo radioactivo (leptina-I¹²⁵) por la unión a un anticuerpo específico. Tras la incubación con el anticuerpo, la hormona libre queda en solución y la hormona unida forma complejos fácilmente precipitables. De esta forma, la cantidad de leptina-I¹²⁵ en el precipitado es inversamente proporcional a la cantidad de leptina en la muestra. Los resultados se obtienen tras extrapolar la radioactividad medida en una curva estándar de leptina murina (0.2-20 ng/ml).



El ensayo se realizó en tubos de polipropileno de 12 ml (Deltalab, España), a 4°C. Se añadieron 100 µl de 0.05 M tampón fosfato (pH=7.4; 0.025M EDTA; 0.08% azida sódica; 1% BSA; 0.05% Tritón x-100), 100 µl de muestra o de solución patrón y 100 µl de antisero antileptina de ratón. Tras incubar los tubos durante 24 h a 4°C, se añadieron 100 µl de leptina-¹²⁵I y se reincubó 24 h a 4°C. Tras precipitar el complejo anticuerpo/leptina-¹²⁵I con polietilenglicol (1 ml/tubo), se centrifugó 30 min a 15000 rpm (Centrifuge 5810, Eppendorf), se decantó el sobrenadante y se midió la radiactividad contenida en el pellet en un contador gamma (1470 WIZARD, Wallac, USA).

5.6.- Determinación de adiponectina

La concentración de adiponectina en plasma se determinó mediante radioinmunoensayo (RIA) específico para adiponectina de ratón, utilizando un kit comercial (Linco Research, USA). El porcentaje de variación intra e interensayo fue del 4.43% y del 7.13%, respectivamente. El ensayo se realizó según lo descrito en el apartado anterior.

6.- Determinación de lípidos en tejido adiposo mesentérico e hígado

La concentración de lípidos totales se determinó en el tejido adiposo mesentérico en el hígado por el método de Folch (Folch et al., 1957) con algunas modificaciones (Herrera y Ayanz, 1972) y lo ha llevado a cabo el departamento de Bioquímica de la Universidad CEU-San Pablo. La extracción lipídica se llevó a cabo en 200 mg de hígado o 100 mg de tejido adiposo mesentérico. En ambos casos, los tejidos se incluyeron en tubos de vidrio (PYREX) que contenían 3 ml de una mezcla de cloroformo:metanol (2:1). Los tubos se agitaron en un rotatubos de inversión (AT-20, MAGNA) durante un periodo mínimo de 10 h. Transcurrido este tiempo, se recogieron los sobrenadante, que se apartaron y se guardaron en otros tubos de vidrio. Los

tejidos se mezclaron de nuevo con 3 ml de la mezcla cloroformo:metanol (2:1), y se agitaron en rotatubos por inversión durante 2 h. Este protocolo se repitió una vez más, guardando los sobrenadantes de cada caso. Posteriormente, los tubos que contenían los sobrenadantes de las anteriores agitaciones se enrasaron a 10 ml con cloroformo:metanol (2:1). Se añadieron 2,5 ml de agua destilada y se agitaron en el rotatubos de inversión durante 15 min. Seguidamente, los tubos se centrifugaron 6 min a 1500 rpm (Centrifuge 5810, Eppendorf Ibérica, España). La fase superior acuosa se eliminó y los tubos se enrasaron con 10 ml de metanol, se añadieron 2.5 ml de 2% NaCl, se agitaron y se centrifugaron 6 min a 1500 rpm, desechando la fase acuosa superior. Este paso se repitió una vez más. Después de 5 min en reposo y habiendo eliminado por completo cualquier resto acuoso, los tubos de volvieron a enrasar a 10 ml con la mezcla cloroformo:metanol (2:1). Por último, en unos tubos de vidrio, previamente pesados, se introdujeron 2 ml de las preparaciones y se evaporaron en un evaporador (speed vac plus sc110a, savant, USA). El extracto seco se pesó, obteniendo así los mg de lípidos totales de las muestras por medida gravimétrica. Los resultados se expresaron en mg de lípidos por g de tejido utilizado.

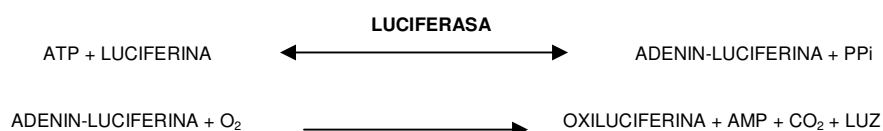
7.- Determinaciones en corazón

7.1. Determinación de triglicéridos

El contenido de triglicéridos en el corazón se determinó siguiendo el método descrito por Zhou y cols (2000). Los corazones se homogeneizaron en un homogenizador de cuchilla (Heidolph DIAX 900, Alemania), utilizando 10 mg de tejido por 200 μ l de tampón A (2 mM NaCl; 20 mM EDTA; 50 mM fosfato sódico, pH=7,4), 200 μ l de tert-butanol (Sigma St Louis, MO) y 100 μ l de metanol:tritón X-100 (1:1). La concentración de TG se determinó en los homogenados, mediante el kit de diagnóstico (Biolabo, España) descrito en el apartado 5.4. Los resultados se expresaron en mg triglicéridos/g tejido.

7.2. Determinación de adenosina 5'-trifosfato (ATP)

La concentración de ATP en corazón se determinó por luminescencia (Bioluminescente Assay kit, Sigma St Louis, MO). El ATP reacciona con luciferina en presencia de luciferasa, para generar adeniluciferina y PP_i . Este compuesto, en presencia de oxígeno, se oxida a oxiluciferina, liberando AMP y CO_2 y emitiendo luz. La cantidad de luz emitida es proporcional a la concentración de ATP presente en la muestra.

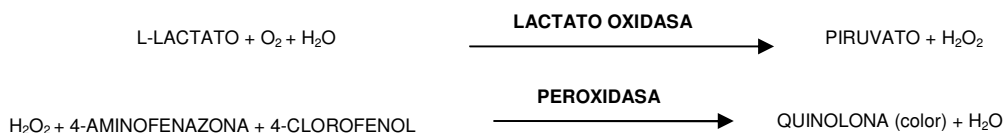


Para este ensayo se tomaron 25 mg de tejido que se homogeneizaron en 500 μ l de 0.1 M tampón fosfato (pH=7,8, 0,1 mM $MgSO_4$; 2 mM EDTA; y 0.2 % BSA), a 4°C. Los homogenados se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 min a 4°C, determinándose en el sobrenadante la concentración de proteínas por el método de Bradford y la concentración de ATP.

El ensayo se realizó en tubos de polipropileno de 3 ml. Primero se añadieron 100 μ l de reactivo (luciferasa, luciferina, $MgSO_4$, EDTA, DTT y BSA), manteniéndose 3 min en reposo. A continuación se añadieron 100 μ l muestras /tubo, e inmediatamente se determinó la emisión de luz en un luminómetro (Berthold Detction System, SIRIUS; España). Para cuantificar la concentración de ATP se utilizó una curva estándar obtenida a partir de soluciones de concentración conocida ($10^{-8}M$ - $10^{-12}M$). La concentración de ATP en las muestras se expresó en moles ATP/mg proteína.

7.3. Determinación de lactato

Para determinar la concentración de lactato se utilizó un método enzimático colorimétrico (Spinreac, Granada, España) que detecta la oxidación de lactato a piruvato y peróxido de hidrógeno por acción de la lactato oxidasa. Este último, en presencia de peroxidasa, 4-aminofenazona y 4-clorofenol forma una quinolona de color rojo, cuantificable a 505 nm y cuya intensidad es proporcional a la concentración de lactato en la muestra.



El tejido se homogeneizó tal y como se ha descrito en el apartado anterior. La muestras se cargaron en una placa de 96 pocillos (2 µl/pocillo) y se diluyeron en 200 µl 50 mM PIPES (pH=7.5) que contenía 4-clorofenol (4 mM), lactato oxidasa (800 U/l), peroxidasa (2000 U/l) y 4-aminofenazona (0.4 mM). La placa se incubó durante 10 min a temperatura ambiente, determinándose la absorbancia a 505 nm en un lector de placas. Para cuantificar la variación de absorbancia se utilizó un calibrador de concentración conocida (10 mg/ml). La concentración de lactato se estableció en función de dicha relación. Los resultados se expresaron en mmol lactato/mg de proteína.

7.4. Determinación de la actividad lactato deshidrogenasa

La determinación de la actividad de lactato deshidrogenada (LDH) se llevó a cabo mediante un método colorimétrico (Biolabo, Francia), basado en el método de Henr (1974). En presencia de LDH, y con NADH como cofactor, el piruvato se reduce a lactato, liberando NAD. El descenso de absorbancia que se produce tras la conversión de NADH en NAD, es directamente proporcional a la actividad de la enzima.

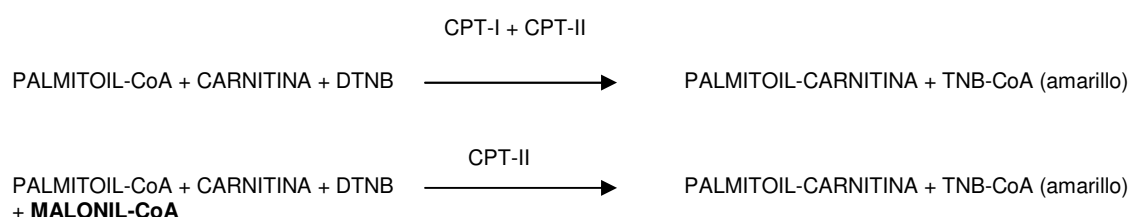


La actividad LDH se determinó en los mismos homogenados preparados para la determinación de lactato, previamente diluidos 1:4 en solución salina.

El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos cargándose 5 µl de muestra por pocillo y 200 µl de una solución Tris 80 mM (pH=7.2) que contenía 1.6 mM piruvato, 0.20 mM NADH y 200 mM NaCl. La placa se incubó a 37°C. La absorbancia se determinó a 340 nm en un lector de placas a 30, 60 y 120 s. Para expresar los resultados se determinó el incremento de absorbancia por minuto. La actividad enzimática se expresó en UI LDH/mg de proteína.

7.5. Determinación de la actividad carnitin-palmitoiltransferasa

La actividad de carnitín-palmitoiltransferasa (CPT) se determinó en corazón, en una preparación enriquecida en mitocondrias, por un método colorimétrico (Boudina et al., 2005). En presencia de CPT, el palmitoil-CoA y la carnitina se transforman en palmitoil-carnitina liberando CoA-SH, el cual reacciona con el ácido 2,2'-dinitro-5,5'-ditiobenzóico (DTNB), formando un compuesto coloreado. De esta forma, la actividad CPT presente en la muestra es proporcional a la absorbancia. La CPT está constituida por CPT-I y CPT-II. La CPT-I se inhibe en presencia de malonil-CoA, de esta forma es posible determinar la actividad total CPT (CPT-I + CPT-II) y la actividad residual o actividad no sensible a malonil-CoA (CPT-II) tras incubación con malonil-CoA.



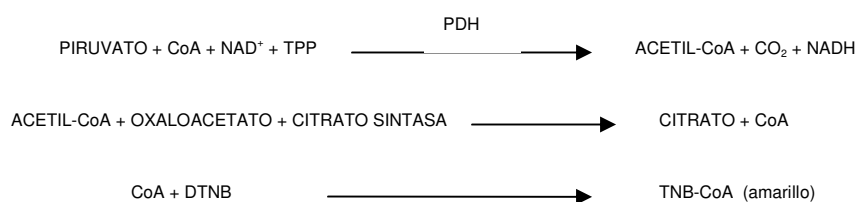
En primer lugar se aislaron las mitocondrias del corazón. Para ello, el corazón (ventrículo izquierdo) (10% p/v) se homogenizó en tampón de aislamiento (20 mM HEPES, pH=7.4, 140 mM KCl, 10 mM EDTA, 5 mM MgCl₂) a 4°C. Los homogenizados obtenidos se centrifugaron a 500 g, 10 min, a 4°C. Se recogieron los sobrenadantes, los cuales se volvieron a centrifugar de nuevo a 9000 g, 35 min, a 4°C conservando el pellet que contiene la fracción enriquecida en mitocondrias. Posteriormente, los pellets se resuspendieron en 150 µl de tampón de aislamiento y se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford. La solución así obtenida se diluyó en tampón de actividad (20 mM HEPES; pH=7.4, 1 mM EGTA, 220 mM sacarosa, 40mM KCl, 1.3 mg/ml BSA) hasta obtener una concentración de proteínas de 1 mg/ml.

El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos, 10 µl de muestra se diluyeron en 100 µl de tampón que contenía: 85 µl de tampón de actividad, 5 µl de 5,5'-ditio-bis-2 ácido nitrobenzoico (DTNB, Sigma St Louis, MO) (0,1 mM) y 10 µl de palmitoil-CoA 40 µM (Sigma St Louis, MO). Se incubaron durante 10 min a 25°C. La reacción se inició después de añadir 5 µl de carnitina 1 mM (Sigma St Louis, MO). Se determinó la absorbancia a 412 nm durante 10 min, cada 2 minutos. Los datos se expresaron como ΔAbs/min/mg prot.

Para el ensayo de inhibición con malonil-CoA, se incluyeron en el tampón final 10 µl de malonil-CoA a diferentes concentraciones 0, 10, 50 y 100 µM (Sigma St Louis, MO). El ensayo se realizó de la misma manera que para cuantificar la actividad total.

7.6. Determinación de la actividad piruvato deshidrogenasa

La actividad piruvato deshidrogenada (PDH) se determinó en corazón, en una preparación enriquecida en mitocondrias, por un método colorimétrico (Szutowicz et al., 1981). El piruvato, por acción de la piruvato deshidrogenasa se transforma en acetil-CoA. Éste acetil-CoA reacciona con oxaloacetato que a través de la citrato sintasa, se transforma en citrato y CoA-SH. Ésta última reacciona con DTNB dando lugar a un compuesto coloreado cuantificable a 412 nm y cuya intensidad es proporcional a la concentración PDH presente en la muestra.

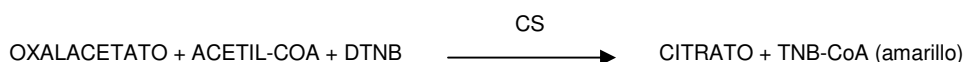


La obtención de las muestras (mitocondrias) para determinar la actividad PDH se llevó a cabo tal y como se ha descrito en el apartado anterior.

El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos, las muestras (20 μ l) se diluyeron en 165 μ l de tampón: 65 μ l de agua miliQ, 40 μ l de 0.25 M TRIS, pH=8.0, 10 μ l de 0.2 M piruvato, 10 μ l de 4 mM CoA, 10 μ l de 40 mM NAD^+ , 10 μ l de 40 mM TPP (todos los reactivos fueron adquiridos en Sigma St Louis, MO). La placa se incubó durante 10 min a 37°C, en oscuridad y en un ambiente húmedo. Transcurrido este tiempo, se añadieron 10 μ l de una solución formada por: 25 mM oxaloacetato (Sigma St Louis, MO) y 1 U citrato sintasa (Sigma St Louis, MO). La placa se incubó de nuevo 10 min en las mismas condiciones. La reacción se inició tras añadir 5 μ l de 0,1 mM DTNB. Se determinó la absorbancia a 412 nm durante 10 min, cada 2 minutos. Los datos se expresaron como $\Delta\text{Abs}/\text{min}/\text{mg prot.}$

7.7. Determinación de la actividad citrato sintasa

La actividad de citrato sintasa (CS) se determinó por un método colorimétrico (Turner et al., 2005). El oxaloacetato y el acetil-CoA por acción de la citrato sintasa, se transforman en citrato y CoA-SH, que reacciona con DTNB dando lugar a un compuesto coloreado. La actividad CS presente en la muestra es proporcional a la absorbancia del producto.

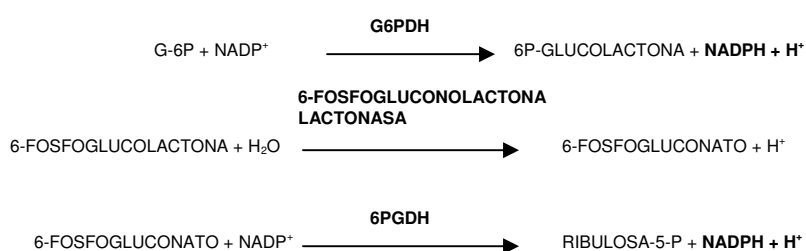


El corazón (ventrículo izquierdo) (10% p/v) se homogenizó en un tampón de homogenización (20 mM HEPES pH=7.4, 140 mM KCl, 10 mM EDTA, 5 mM MgCl₂). Los homogenados se recogieron en eppendorf y se determinó la concentración de proteínas presente en los mismos.

El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos, las muestras (10 µl) se diluyeron en 100 µl de tampón de homogenización, 5 µl de 0.1 mM DTNB, 20 µl de 0.1 mM acetil-CoA (Sigma St Louis, MO) y 10 µl tritón 10%, se incubaron a 25°C 10 min. La reacción se inició al añadir 10 µl de 0.05 mM oxalacetato (Sigma St Louis, MO), Se determinó la absorbancia a 412 nm durante 10 min, cada 2 minutos. Los datos se expresaron como ΔAbs/min/mg prot.

7.8. Determinación de la actividad glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa

La actividad de la glucosa 6-fosfato deshidrogenada (G6PDH) se determinó por un método colorimétrico (Tian et al, 1998). La glucosa-6-fosfato (G-6P) es oxidada en dos pasos a CO₂ y ribulosa 5-fosfato, en presencia de NADP como cofactor, por la G6PDH, en el primer paso y la 6-fosfogluconato deshidrogenada (6PGDH), en el segundo paso, liberando 2 moléculas de NADPH y H⁺, que presenta un máximo de absorbancia a 340 nm. La formación de NADPH, es directamente proporcional a la actividad de la enzima.



La actividad de G6PDH se determinó en corazón (20 mg), para ello se homogeneizaron en 200 µl de tampón (20 mM HEPES pH=7.4, 130 mM sacarosa, 50 mM KCl, 10 mM EDTA y 0.5 mM DTT) a 4°C. Los homogenados se recogieron en eppendorf y se centrifugaron a 16000 g, 30 min a 4°C, sobre los homogenados se determinó la concentración de proteínas ajustándose las muestras a 1 mg/ml con tampón de homogeneización.

La actividad de G6PDH total (actividad G6PDH + actividad 6PGD) se determinó en una placa de 96 pocillos. La reacción se lleva a cabo añadiendo a cada uno de los pocillos: las muestras (10 μ l) se diluyeron en 60 μ l de tampón de actividad (5 mM TRIS, 1 mM $MgCl_2$, pH=8.1), 10 μ l de 2 mM G-6P (se preparó en agua, Sigma St Louis, MO) y 10 μ l de 2 mM fosfogluconato (se preparó en 1 M HCl, Sigma St Louis, MO). La reacción se inició al añadir 10 μ l de 1 mM $NADP^+$ (se preparó en agua, Sigma St Louis, MO) y se monitorizó a 340 nm, 10 min a 37°C.

Por otro lado, la actividad de 6PGDH se determinó igual pero sustituyendo la G-6P (10 μ l) por agua (10 μ l).

La actividad de G6PDH se determinó calculando la diferencia entre la actividad de G6PDH total y la actividad 6PGD. Los resultados se expresaron en Abs/mg proteína /min.

7.9.- Determinación de la producción de anión superóxido

La producción basal de anión superóxido (O_2^-) Se determinó en corazón fresco por quimioluminiscencia (Janiszewski y cols, 2002; Guzik y Chanon, 2005). Este método se basa en la cuantificación de los fotones emitidos por la lucigenina al interaccionar con el anión O_2^- .

Inmediatamente, tras diseccionar el corazón (20 mg), los explantes se incubaron en tubos que contenían 1 ml de tampón HEPES (20 mM HEPES pH=7.4, 100 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2 mM $CaCl_2$, 25 mM $NaHCO_3$, 1 mM KH_2PO_4 , 1.2 mM $MgSO_4$ y 11 mM glucosa), burbujeados con carbógeno, a 37°C durante 30 min. Tras este periodo de estabilización, los tubos se mantuvieron a temperatura ambiente hasta determinar la actividad enzimática.

En primer lugar se determinó la emisión basal de O_2^- (blanco). Se introdujo en el luminómetro un tubo que contenía 1ml tampón HEPES al que se le añadieron 10 μ l de lucigenina (10 μ M). Se midió la emisión de luz (en cuantos de luz) durante 5 min, registrándose los cuantos cada 30 s. A continuación, se introdujo el explante de corazón en ese mismo tubo y se determinó, igual que antes, considerándose la emisión de los cuantos emitidos (Σ cuantos) como la emisión basal de O_2^- por el corazón. Una vez determinada la producción de O_2^- , los explantes se desecaron durante 24 h en una estufa a 65°C y se pesaron (mg) para realizar los cálculos.

Para determinar la medida de O_2^- se aplicó la siguiente ecuación:

Medida de O_2^- = (Σ cuantos basales con explante - Σ cuantos basales sin explante)/peso.

8.- Técnica de Western Blot

8.1.- Obtención de las muestras a partir de los diferentes tejidos (corazón, hígado, hipotálamo y tejido adiposo lumbar)

El corazón (ventrículo izquierdo) se homogeneizó a 4°C, en tampón de lisis (25 mg tejido/500 µl) que contenía: 0,42 mM NaCl, 1 mM Na₄P₂O₇, 1 mM ditioneitol (DTT), 20 mM HEPES pH=7.9, 20 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 20% glicerol, 2 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), 1 µl/ml leupeptina, 1 µl/ml aprotinina y 0,5 µl/ml N-α-p-tosil-l-lisina en clorometilcetona (TLCK), utilizando un homogeneizador de cuchilla (Heidolph DIAX 900, Alemania). Los homogenados se sometieron a choque térmico (3 veces consecutivas, congelación en N₂ líquido y descongelación a 37°C). Posteriormente, se centrifugaron 10 min a 4°C a 10.000 rpm (EBA 12R, Hettich Zentrifugen, Alemania). Tras determinar la concentración de proteínas en los sobrenadantes, las muestras se ajustaron a 2 mg/ml de proteína con reactivo de Laemli (50 mM Tris, pH=6.8), 10% glicerol, 10% dodecil sulfato sódico (SDS), 5% β-mercaptoetanol, 2 mg/ml azul de bromofenol y se conservaron a -20 °C hasta la realización de los experimentos de western blot.

Las muestras de hígado (30 mg tejido/500 µl tampón de lisis) y de hipotálamo (1 hipotálamo/300 µl tampón de lisis) se homogeneizaron en un homogeneizador de teflón (GLAS-COL, Alemania). Los homogenados obtenidos se procesaron y ajustaron a proteínas de la misma forma.

Las muestras de tejido adiposo lumbar (TAL) se homogeneizaron en tampón de lisis (30 mg/500 µl; 20 mM HEPES pH=7.8, 1 mM Na₄P₂O₇, 100 mM NaF, 7,5 mM Na₃VO₄, 5 mM EDTA, 20% glicerol, 1% tritón x-100, 1 µl/ml leupeptina, 1 µl/ml aprotinina y 0,5 µl/ml TLCK) con un homogeneizador de cuchilla. Los homogenados obtenidos se mantuvieron en reposo 30 min en hielo, agitando cada 5 min. Seguidamente, se centrifugaron a 17000 g, 30 min a 4°C. Se recogieron los sobrenadantes y se ajustaron a proteínas de la misma forma.

8.2.- Determinación de la concentración de proteínas totales

La concentración de proteínas se determinó mediante un ensayo colorimétrico según el método descrito por Bradford (1976). Este método se basa en la reacción de los grupos sulfonados ácidos del azul de Coomassie (reactivo de Bradford) con los grupos amino libres de los aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina) de las proteínas.

Esta reacción da como resultado compuestos coloreados (marrón) que presentan un máximo de absorbancia a 595 nm.

El ensayo se realizó en una placa de 96 pocillos. Las muestras (50 µl/pocillo) previamente diluidas en tampón salino fosfato (PBS) (1:1000) se incubaron con 200 µl de reactivo de Bradford durante 5 min a 25°C. Pasado este tiempo se determinó la absorbancia a 595 nm. Para cuantificar la concentración de proteínas se utilizó una curva patrón de albúmina bovina (BSA): 0, 1, 5, 7 y 10 µg/ml.

8.3.- Detección de proteínas por Western blot

El Western blot es una técnica de inmunotransferencia utilizada para la detección de proteínas en un lisado celular. Por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) las proteínas se separan en función de su peso molecular, posteriormente se transfieren a una membrana de nitrocelulosa, para así ser visualizadas por inmunodetección.

En un sistema *Mini-protean* (Bio Rad, España) se preparan los geles sobre los que se separarán las proteínas:

- Gel de separación o gel 1. Este gel permite la separación de las proteínas en función de su peso molecular. La concentración de poliacrilamida depende del peso molecular de la proteína a detectar.
- Gel de concentración o gel 2. Este gel concentra todas las proteínas para que comiencen a separarse. Contiene 3,075 ml H₂O, 0,5M Tris-HCl pH=6,8 (1.25 ml), 20% SDS (0.05 ml), 0,67 ml acrilamida/bisacrilamida, 0,025 ml persulfato amónico, 0,005 ml N,N,N',N'-tetra-metil-etilen-diamina (TEMED).

Las muestras (50 µg proteína/pocillo), previamente calentadas a 100°C durante 5 min, se separaron por electroforesis en tampón electrodo (0.2 M glicina, 0.025 M Tris y 0.1% SDS) 200 V, 45 min a 25°C.

Tras la electroforesis, los geles se colocaron en un sistema “*sandwich*”, para llevar a cabo la transferencia de las proteínas desde el gel a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF, Amersham, Reino Unido), en tampón de transferencia (0.2 M glicina, 0.025 M Tris, 0.1% SDS y 20% metanol), 400 mA, 60 min, a 4°C.

Una vez completada la transferencia, las membranas se lavaron (4x 5min), con una solución de lavado (leche en polvo desnatada al 0,1% en tampón fosfato salino con Tween 20 (PBS-T) al 0,5%) y se incubaron en una disolución de bloqueo (leche en polvo desnatada al 5% en PBS-T) durante 60 min a temperatura ambiente en agitación (GYRO-ROCKER STR9, China) Transcurrido este tiempo, se lavaron de nuevo (4x5 min) con la misma solución de lavado, y se incubaron a 4°C durante 24 h en una solución (0,05%

BSA, 0,05% azida, 0,05% PBS-T) con los anticuerpos/antisueros primarios correspondientes. Transcurrido este tiempo, las membranas se volvieron a lavar (4x5 min) y a incubar con el anticuerpo/antisuero secundario correspondiente marcado con peroxidasa, en una solución de leche desnatada al 1% en PBS-T, durante 60 min a temperatura ambiente.

Por último, las membranas se lavaron (4x 5min) y se revelaron las bandas de las diferentes proteínas por quimioluminiscencia usando un sistema de detección kit ECL o ECL Plus (Amershan, Bioscience, Reino Unido). Este proceso está basado en una reacción enzimática por la cual un éster de acridinio reacciona con peróxido de hidrógeno en condiciones ligeramente alcalinas, produciendo una luz de emisión muy intensa y de larga duración. Para ello las membranas se cubrieron con la mezcla de ECL siguiendo las recomendaciones del fabricante. A continuación, se exponen a una película fotográfica Kodat X-OMAT (Hyperfilm ECL Amershan International, Alemania) en las que quedan impregnadas las bandas que posteriormente se revelan.

Para la cuantificación de las proteínas, las bandas obtenidas por western-blot se densitometraron utilizando un programa informático *Quantity One* (Windows Software Bio-Rad's Image Análisis System). Las mismas membranas se utilizaron para determinar la expresión de las proteínas que sirven como control de carga, a fin de corregir la expresión de la proteína detectada anteriormente para cada muestra.

8.3.1.- Detección del grado de fosforilación de STAT3 (pSTAT3)

La expresión de la STAT3 fosforilada en el residuo tirosina 705 (Tyr⁷⁰⁵) (pSTAT3, 89 kDa) se llevó a cabo en hipotálamo, tejido adiposo lumbar, hígado y corazón. La electroforesis se realizó en geles de acrilamida/bisacrilamida al 10%: H₂O (4,1 ml), 1,5 M Tris-HCl (2,5 ml) pH=8,8, 20% SDS (0,05 ml); acrilamida/bisacrilamida (3.3 ml), 0,05 ml 10% persulfato amónico, 0,005 ml TEMED). Como anticuerpo primario se utilizó un anticuerpo policlonal de conejo anti-pSTAT3 (1:1000; Cell Signallin Technology, EE UU). Como anticuerpo secundario se utilizó una IgG anticonejo (1:5000; Amersham Bioscience, Reino Unido), marcada con peroxidasa. Para la detección se utilizó el kit ECL plus.

En las mismas membranas se detectó la proteína STAT3 (89 kDa) utilizando un anticuerpo primario policlonal de conejo anti-STAT3 (1:500; Santa Cruz Biotechnology, EE UU) y como anticuerpo secundario, una IgG anticonejo (1:8000; Amersham Bioscience, Reino Unido), marcada con peroxidasa. Para la detección se utilizó el kit ECL. La cuantificación se llevó a cabo estableciéndose la relación entre ambas proteínas (pSTAT3/STAT3).

8.3.2.- Detección de las proteínas desacoplantes de membrana 1, 2 y 3 (UCP-1, UCP-2, UCP-3)

La expresión de UCP-1, UCP-2 y UCP-3 (32 kDa) se determinó en corazón. La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida al 15%: H₂O (2,4 ml), 1,5 M Tris-HCl pH=8,8 (2,5 ml), SDS 20% (0,05 ml), Acrilamida/Bisacrilamida (5 ml), persulfato amónico 10% (0,05 ml), TEMED (0,005 ml). Como anticuerpo primario para UCP-1 se utilizó un anticuerpo policlonal de conejo anti-UCP-1 (1:1000; Affinity BioReagent, USA). Como anticuerpo secundario una IgG anticonejo (1:2000; Amersham Bioscience, Reino Unido), marcada con peroxidasa. Como anticuerpo primario para UCP-2, se utilizó un anticuerpo policlonal de cabra anti-UCP-2 (1:100; Santa Cruz Biotechnology, Inc, EEUU). Como anticuerpo secundario se utilizó una IgG anticabra (1:15000; Calbiochem, EE UU) marcada con peroxidasa. Como anticuerpo primario para UCP-3 se utilizó un anticuerpo policlonal de conejo anti-UCP-3 (1:1000; Affinity BioReagent, USA). Como anticuerpo secundario una IgG anticonejo (1:2000; Amersham Bioscience, Reino Unido), marcada con peroxidasa. Para la detección de las bandas se utilizó el kit ECL plus.

Como control de carga se determinó la expresión de β -actina (49 kDa), utilizando un anticuerpo primario monoclonal de ratón anti- β -actina (1:500; Affinity Bioreagents, Golden, EE UU). Como anticuerpo secundario se utilizó una IgG antiratón (1:10000; Amersham Bioscience, Reino Unido), marcada con peroxidasa. Para detectar las bandas se utilizó el kit ECL. La cuantificación se llevó a cabo estableciéndose la relación entre ambas proteínas: UCP-1/ β -actina ; UCP-2/ β -actina y UCP-3/ β -actina.

8.3.3.- Detección del grado de fosforilación de AMPK (pAMPK)

La expresión de la AMPK fosforilada en el residuo treonina 172 (Thr¹⁷²) (pAMPK) se llevó a cabo en corazón. La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida al 10%. Para la detección de pAMPK (62 kDa) se utilizó un anticuerpo primario policlonal de conejo (1:1000; Cell Signalling Technology, EE UU). Como anticuerpo secundario una IgG anticonejo (1:4000; Amersham Bioscience, Reino Unido), marcada con peroxidasa. Para la detección se utilizó el kit ECL plus.

En las mismas membranas, se determinó la expresión de la proteína en su forma no fosforilada (AMPK- α , 62 kDa). Se utilizó un anticuerpo primario policlonal de conejo (1:1000; Cell Signalling Technology, EE UU). El anticuerpo secundario se utilizó en las mismas condiciones que en el caso anterior. Para la detección se utilizó el kit ECL. La cuantificación se llevó a cabo estableciéndose la relación entre ambas proteínas: pAMPK/AMPK.

8.3.4.- Detección del grado de fosforilación de Akt (pAkt)

La expresión de la proteína Akt fosforilada en el residuo serina 473 (Ser⁴⁷³) (pAKT, 60 kDa) se llevó a cabo en corazón. La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida al 10%. Para la detección de pAkt se utilizó un anticuerpo primario policlonal de conejo (1:1000; Cell Signalling Technology, EE UU). Como anticuerpo secundario una IgG anticonejo marcada con peroxidasa (1:4000; Amersham Bioscience, Reino Unido) Para la detección se utilizó el kit ECL plus.

En la misma membrana, se determinó la expresión de la proteína en su forma no fosforilada (Akt, 60 kDa) utilizando un anticuerpo primario policlonal de conejo (1:1000; Cell Signalling Technology, EE UU). Como anticuerpo secundario se utilizó IgG anticonejo marcadas con peroxidasa (1:4000; Amersham Bioscience, Reino Unido). Para la detección se utilizó el kit ECL. La cuantificación se llevó a cabo estableciéndose la relación entre ambas proteínas: pAkt/Akt.

8.3.5.- Detección de las proteínas antioxidantes: Mn-SOD, Cu/Zn-SOD y catalasa

La expresión de las enzimas antioxidantes: Mn-SOD (25 kDa), Cu/Zn-SOD (19 kDa) y catalasa (60 kDa) se realizó en corazón. La electroforesis se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 15%. Para la detección de la Mn-SOD se utilizó un anticuerpo primario policlonal de conejo (1:10000; Sigma St Louis, MO) y como anticuerpo secundario, una IgG anticonejo marcada con peroxidasa (1:5000; Amersham Bioscience, Reino Unido). Para la detección de la Cu/Zn-SOD se utilizó un anticuerpo primario policlonal de conejo (1:10000; Sigma St Louis, MO) y como anticuerpo secundario, una IgG anticonejo marcada con peroxidasa (1:2500; Amersham Bioscience, Reino Unido). Para la detección de la catalasa se utilizó un anticuerpo primario policlonal de ratón (1:10000; Sigma St Louis, MO) y como anticuerpo secundario, una IgG antiratón marcada con peroxidasa (1:5000; Amersham Bioscience, Reino Unido). Para la detección se utilizó el kit ECL.

Como control de carga se determinó la expresión de la proteína β -actina. Los resultados se expresaron como la relación entre ambas proteínas para cada una de las proteínas determinadas: Mn-SOD/ β -actina; Cu/Zn-SOD/ β -actina y catalasa/ β -actina.

9.- Microscopía electrónica de corazón

El estudio de microscopía electrónica se llevó a cabo en el corazón de animales de 14 y 32 semanas de dieta DIO.

Las muestras (1 mm³) se fijaron en una mezcla de 2.5 % glutaraldehído (Sigma St Louis, MO) en 0.1 M cacodilato sódico (1:50, Sigma St Louis, MO) y se guardaron a 4°C durante 4 h. Pasado este tiempo, las muestras se incluyeron en 0.1 M cacodilato sódico y se guardaron a 4°C hasta su inclusión en resina. Posteriormente, las muestras se sometieron a una postfijación, incluyéndose en tubos de cristal con 1 % tetra-óxido de osmio durante 2 h a 25°C, en agitación y en campana. Seguidamente, se lavaron con agua destilada (5 veces x 1 min), se sometieron a un proceso de deshidratación, pasando por concentraciones creciente de acetona (30, 50, 70, 80, 90, 95 y 100 %) (3 veces x 5 min, para cada concentración). Por último se llevó a cabo la inclusión en resina preparando una mezcla de acetona y resina: i) acetona 100% (3 volúmenes):resina (1 volumen) durante 1h en oscuridad a 25°C, ii) acetona 100% (1 volumen):resina (1 volumen) durante 1h en oscuridad a 25°C, (x 2 veces) y iii) resina pura durante 12 h en oscuridad a 25°C. La resina se dejó polimerizar 48 h a 70°C, quedando las muestras incluidas y listas para ser cortadas. Los bloques de resina se cortaron en secciones semifinas de 5 µm de espesor y se tiñeron con 0.3 % azul de toluidina. A partir de estos cortes semifinos se realizaron secciones ultrafinas, que se recogieron en rejillas y fueron observadas al microscopio electrónico (Jeol Transmission Electron Microscope). La obtención de los cortes y la obtención de las imágenes de microscopía electrónica se llevaron a cabo en el centro de microscopía electrónica de la Universidad Complutense de Madrid.

10.- Parámetros hemodinámicos y electrocardiograma

Los parámetros hemodinámicos: presión arterial sistólica y diastólica (PAS y PAD) y la frecuencia cardíaca (FC), se determinaron de forma directa en los animales previamente anestesiados con pentobarbital sódico (50 mg/kg i.p.). Para ello, se insertó en la arteria femoral derecha un catéter especial modificado (diámetro externo=40µm, diámetro interno=25µm, *Micro-renathane implatation tubing*, Bioseb, Francia) conectado a un transductor de presión (Statham, Harvard Aparatos GMBH, Alemania). La onda de presión arterial se registró mediante el sistema de adquisición de datos PowerLab 4/30 y se analizó mediante el programa de análisis LabChart 7.0 Pro (ADInstruments).

Para el electrocardiograma, se colocaron los electrodos en las patas superiores derecha e izquierda, y en la pata inferior derecha del ratón (derivación I). Los electrodos se acoplaron a un amplificador de señal (Animal BioAmp, AD Instrument, UK). La señal se recogió mediante el sistema de adquisición de datos PowerLab 4/30 y los resultados se analizaron mediante el programa de análisis de registros LabChart 7.0 Pro (ADInstruments).

El estudio hemodinámico así como el electrocardiograma se han llevado a cabo en el departamento de Fisiología de la Universidad Autónoma de Madrid

11.- Análisis estadístico

El análisis de los resultados se realizó utilizando el programa de análisis estadístico Stat View (1999, SAJ Institute, EEUU). Las comparaciones de los resultados obtenidos se realizaron utilizando el análisis de la varianza de una vía (ANOVA-1) o de dos vías (ANOVA-2), seguida del test de Newman-Keuls para comparaciones múltiples. Se consideraron grupos significativamente distintos desde el punto de vista estadístico, cuando $p < 0.05$.

CAPÍTULO I
CARACTERIZACIÓN DEL MODELO DIO

CARACTERIZACIÓN DEL MODELO DIO

INTRODUCCIÓN

Los AG procedentes de la dieta son la principal fuente de energía para el corazón y el músculo esquelético en reposo. La fracción no consumida se almacena en el tejido adiposo en forma de TG, constituyendo así un reservorio energético capaz de hacer frente a situaciones que cursen con déficit de energía como el ayuno o el ejercicio prolongado (Frayn et al., 2002). Sin embargo, un consumo prolongado de dietas ricas en grasa puede superar la capacidad tamponadora del tejido adiposo, favorecer la hipertrofia del adipocito y cambiar el patrón de síntesis/liberación de adipoquinas. Además, los lípidos pueden empezar a acumularse en tejidos como el hígado, el músculo esquelético o el corazón dando lugar a esteatosis y lipotoxicidad (Unger 2003).

La leptina es una hormona clave en la oxidación de los AG en tejidos no adiposos. Esta hormona es secretada por los adipocitos y su producción es proporcional a la cantidad de tejido adiposo presente en el organismo. La leptina controla la oxidación de los AG ya que es capaz de regular la expresión y/o actividad de enzimas implicadas en la β -oxidación (Shimabukuro et al., 1997; Zhou et al., 1997; Minokoshi et al., 2002). En condiciones en las que existe un balance energético equilibrado, la grasa consumida en la dieta es captada y metabolizada por los tejidos no adiposos para satisfacer sus necesidades energéticas. En condiciones de sobrealimentación existe un balance energético positivo donde la grasa consumida excede las necesidades energéticas. En estas situaciones, el tejido adiposo aumenta para hacer frente a dicho exceso de grasa. La secreción de leptina también aumenta junto con el tejido adiposo, contribuyendo a la sobreexpresión de sistemas enzimáticos relacionados con la β -oxidación y el desacoplamiento mitocondrial, que disipa el exceso de energía en forma de calor (Wang et al., 1999; Lee et al., 2001; Unger and Orci, 2001; Somoza et al., 2007). Sin embargo, en situaciones de resistencia a leptina, los AG pueden almacenarse en dichos tejidos no adiposos causando estosis y lipotoxicidad (Listenberg et al., 2003; Unger 2003; Unger 2005).

Los mecanismos y circuitos encaminados a mantener la homeostasis energética pueden estar alterados en animales alimentados con dietas ricas en grasas (HF). Así, al alimentar a ratones con dieta rica en grasa saturada se produce sobrepeso, hiperleptinemia, resistencia hipotalámica a leptina y obesidad. En un estudio previo, hemos observado que ratones sometidos a 8 semanas de dieta HF

presentan un incremento de su tejido adiposo e hiperleptinemia, que se acompaña de resistencia a leptina en hipotálamo (Münzberg et al., 2004) pero no en corazón, donde los receptores cardiacos de leptina mantienen íntegra su respuesta a dicha hormona (Somoza et al., 2007). Este hecho evidencia la posibilidad de que la resistencia a leptina derivada del consumo de dietas HF sea tejido dependiente, lo que puede ser considerado un tema de interés a estudiar más detalladamente. Nuestra hipótesis es que la resistencia a leptina en un modelo DIO puede aparecer de manera diferente en función del tejido estudiado y nos preguntamos si dicha resistencia a leptina detectada en un determinado órgano o tejido, podría tener relación con la acumulación de lípidos en los mismos. Para establecer esta posible relación entre la resistencia a leptina y la acumulación lipídica hemos caracterizado en este estudio la evolución del modelo DIO mediante el estudio de i) el peso corporal, ii) el peso de los diferentes tejidos adiposos (lumbar y mesentérico) así como del hígado y del corazón, iii) el contenido lipídico del tejido adiposo, el hígado y el corazón y iv) la respuesta a leptina aguda en dichos órganos y tejidos, medida mediante el grado de fosforilación de la STAT-3. El estudio se ha llevado a cabo en ratones C57BL/6J de 4 semanas de edad alimentados con una dieta control (LF) o una dieta rica en grasa (HF) durante 4, 8, 16 y 32 semanas.

RESULTADOS

1.- Evolución de peso corporal

Se realizó un control del peso corporal y de la ingesta dos veces por semana durante las 32 semanas que duró el tratamiento. Como se observa en la figura 1, la dieta HF aumentó significativamente el peso corporal a partir de la segunda semana de tratamiento dietético (1-ANOVA $F_{(1,38)}=57.213$, $*p<0.05$). Esta diferencia fue aumentando tras 4 (1-ANOVA $F_{(1,32)}=51.028$, $***p<0.001$), 8 (1-ANOVA $F_{(1,29)}=454.369$, $***p<0.001$), 16 (1-ANOVA $F_{(1,25)}=354.168$, $***p<0.001$) y 32 (1-ANOVA $F_{(1,30)}=879.046$, $***p<0.001$) semanas de dieta.

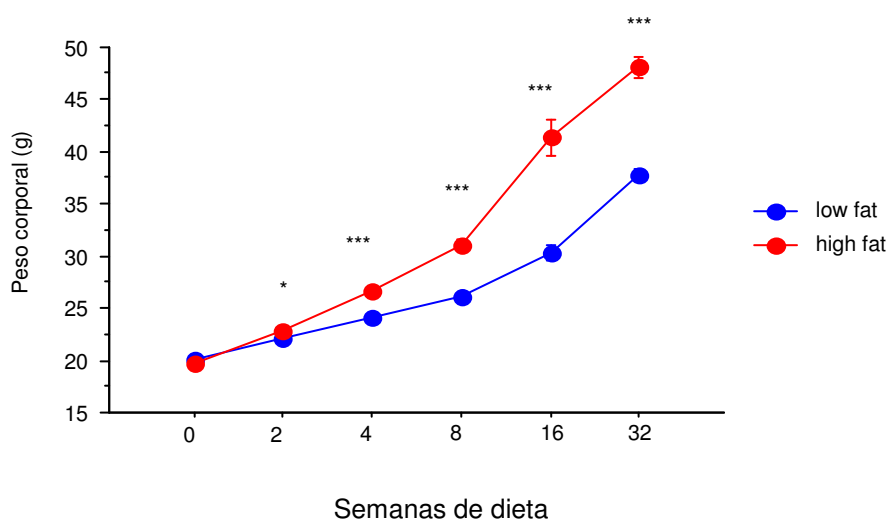


Figura 1. Efecto de la dieta sobre la evolución del peso corporal. En color azul se representa el peso corporal de los animales LF; y en color rojo, los animales HF. Los datos se expresan como la media del peso corporal (g) \pm E.S.M. $n= 12-18$ animales/grupo ($*p<0.05$, $***p<0.001$; *test de Newman Keuls*).

2.- Determinación de la ingesta

Se determinó la cantidad de comida ingerida por cada grupo experimental. La cantidad de comida ingerida, expresada en gramos, fue mayor en el grupo LF que en el grupo HF (Figura 2a). No obstante, cuando se analizó la ingesta calórica no se observaron diferencias entre grupos (Figura 2b). Hay que recordar que las dietas no presentan el mismo contenido calórico, ya que la dieta LF aporta 3.85 kcal/g mientras que la dieta HF aporta 4.73 kcal/g. En base a estos resultados parece que el aumento de peso detectado en el grupo HF no se debe a una mayor ingesta calórica, sino que podría estar relacionado con la composición de la dieta.

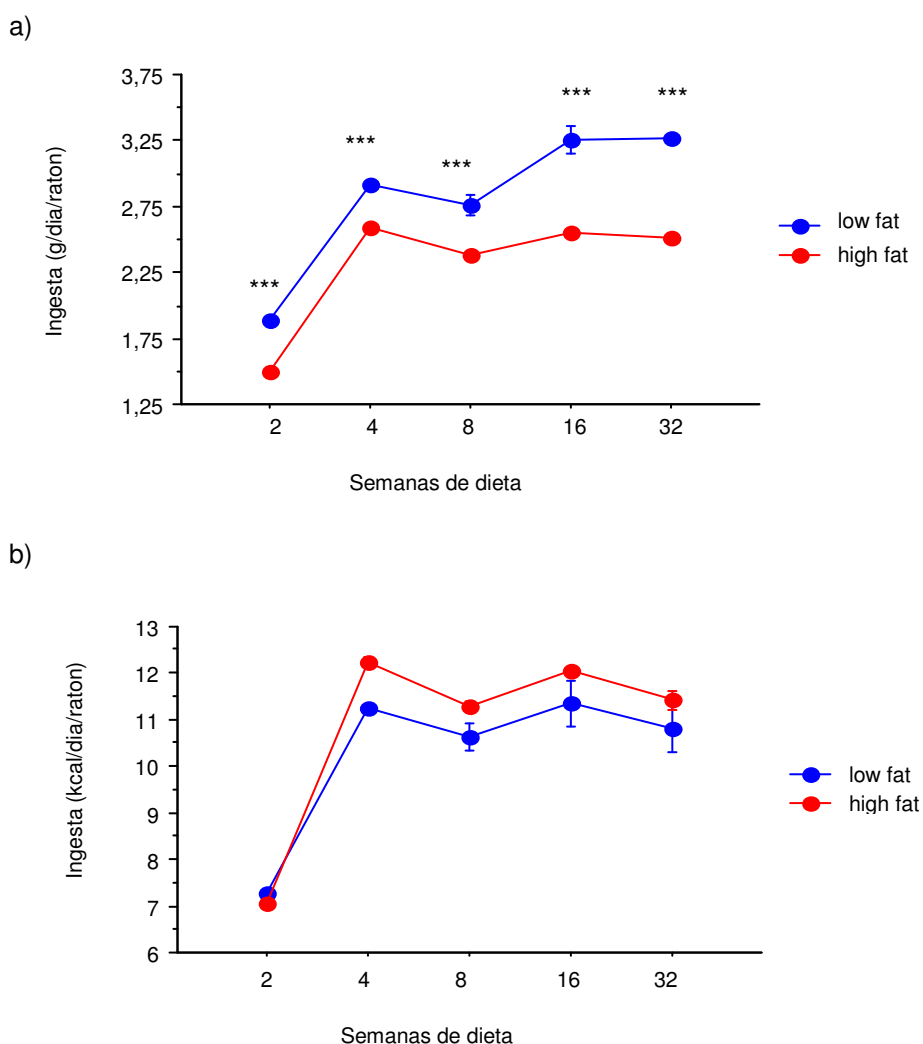


Figura 2. Evolución de la ingesta expresada en gramos (a) o en calorías (b). En color azul se representa la ingesta de los animales LF; y en color rojo, los animales HF. Los datos se expresan como la media de la ingesta en gramos (a) o calorías (b) por día y animal \pm E.S.M. n= 12-18 animales/grupo (**p<0.01; ***p<0.001; *test de Newman Keuls*).

3.- Cálculo de la eficiencia calórica

La eficiencia calórica es un parámetro metabólico que permite relacionar la ganancia de peso con las calorías ingeridas. Como se muestra en la figura 3, la dieta HF aportó una eficiencia calórica mayor que la dieta LF durante todo el tratamiento (***) $p < 0.001$)

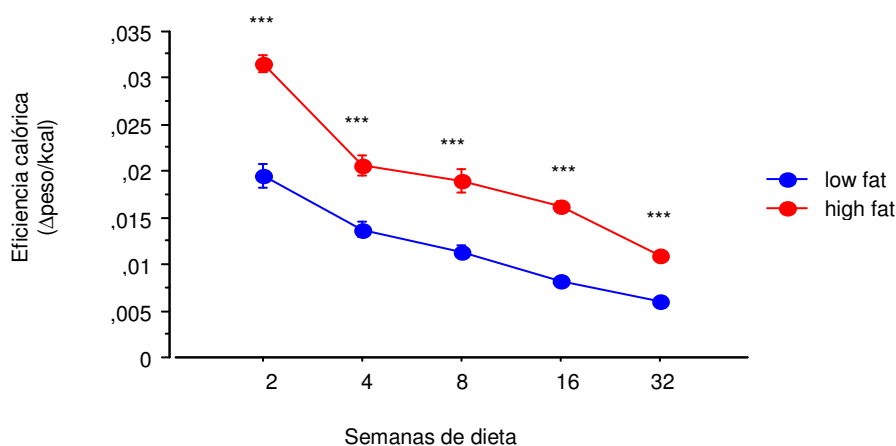


Figura 3. Evolución de la eficiencia calórica a lo largo del tratamiento dietético. En color azul se representa la eficiencia calórica de los animales LF; y en color rojo, los animales HF. Los datos se expresan como la media de la ganancia de peso (g) por calorías y día, por animal \pm E.S.M. $n = 12-18$ animales/grupo. *** $p < 0.001$; *test de Newman Keuls*).

4.- Evolución del peso de los tejidos adiposos mesentérico y lumbar, hígado y corazón

Como se muestra en la tabla 1, la dieta HF aumentó significativamente el peso absoluto de los tejidos adiposos lumbar y mesentérico a lo largo de todo el tratamiento. El tejido adiposo lumbar aumentó significativamente tras 4 semanas de dieta HF (1-ANOVA, $F_{(1,30)} = 21.943$, *** $p < 0.001$), manteniéndose tal incremento durante todo el tratamiento dietético. En cuanto al tejido adiposo mesentérico, la diferencia entre ambos grupos no se detectó hasta las 8 semanas de dieta (1-ANOVA, $F_{(1,18)} = 6.53$, ** $p < 0,01$) y se mantuvo significativa hasta las 32 semanas.

El hígado aumentó su peso tras 16 (1-ANOVA, $F_{(1,24)} = 37.791$, *** $p < 0,001$) y 32 semanas (1-ANOVA, $F_{(1,25)} = 75.172$, *** $p < 0,001$) de dieta HF. Curiosamente, en el grupo HF se detectó una disminución de su peso a las 4 semanas de dieta (1-ANOVA, $F_{(1,15)} = 4.878$, * $p < 0.05$).

En el corazón se observó un aumento de su peso tras 4 semanas de dieta HF (1-ANOVA, $F_{(1,15)} = 11.308$, $***p < 0.001$), que desapareció tras 8 y 16 semanas de tratamiento. Al cabo de 32 semanas, el grupo HF mostró un leve incremento en el peso del corazón (1-ANOVA, $F_{(1,30)} = 5.24$, $*p < 0.05$).

Con el fin de analizar la evolución del peso de los tejidos adiposos, del hígado y del corazón con respecto al peso corporal, se determinó el peso relativo. Como se observa en la figura 4, el peso relativo de los tejidos adiposos aumentó independientemente de la dieta. El tejido adiposo lumbar aumentó más en los estadios iniciales (78% y 223% tras 4 y 8 semanas, respectivamente) que en los estadios finales (100% y 29% tras 16 y 32 semanas, respectivamente). El tejido adiposo mesentérico aumentó tras 8 semanas y continuó aumentando hasta el final del tratamiento (9%, 52% y 15% a las 8, 16 y 32 semanas, respectivamente). En el hígado, el aumento de peso se detectó en los estadios más avanzados (25% y 53% a las 16 y 32 semanas, respectivamente). El corazón, por el contrario, no mostró diferencias entre ambos grupos a lo largo del tratamiento.

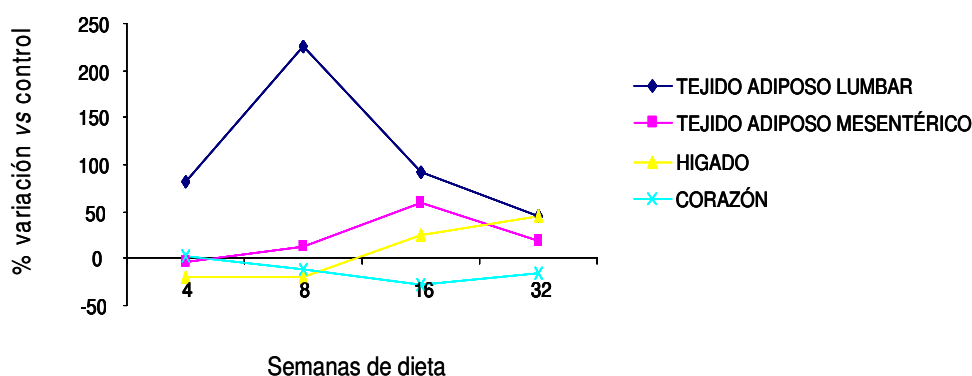


Figura 4. Evolución del peso relativo de los tejidos adiposos lumbar y mesentérico, del hígado y del corazón a lo largo del tratamiento dietético. Los datos se expresan como % del peso de los tejidos en relación con el peso corporal del animal, respecto al grupo LF durante 4, 8, 16 y 32 semanas. (n=12-18 animales/grupo). En azul se representa el tejido adiposo lumbar (TAL), en rosa el tejido adiposo mesentérico (TAM), en amarillo el hígado y en verde el corazón.

| | 4 sem | | 8 sem | | 16 sem | | 32 sem | |
|----------|--------------|-------------------------|--------------|-------------------------|--------------|---------------------------|---------------|---------------------------|
| | Low fat | High fat | Low fat | High fat | Low fat | High fat | Low fat | High fat |
| TAL (mg) | 72.7 ± 3.6 | 144.2 ± 14.0 *** | 170.6 ± 40.8 | 381.4 ± 30.2 *** | 197.2 ± 15.3 | 477.8 ± 15.4 *** | 503.1 ± 22.1 | 811.5 ± 81.9 *** |
| TAM (mg) | 292.7 ± 12.4 | 317.3 ± 19.5 | 342.8 ± 36.2 | 825.9 ± 71.8 ** | 483.7 ± 32.6 | 914.8 ± 123.3 ** | 945.0 ± 64.4 | 1437.4 ± 101.3 *** |
| HIG (mg) | 1006.0 ± 2.6 | 931.0 ± 2.5 * | 922.1 ± 20.3 | 895.3 ± 41.1 | 990.4 ± 63.1 | 1800.3 ± 105.2 *** | 1530.7 ± 91.1 | 2840.8 ± 151.1 *** |
| COR (mg) | 118.1 ± 3.3 | 138.6 ± 4.9 *** | 138.4 ± 3.1 | 147.5 ± 3.5 | 147.1 ± 3.6 | 150.4 ± 3.9 | 162.5 ± 2.8 | 171.3 ± 2.4 * |

Tabla 1. Evolución del peso absoluto los diferentes tejidos a lo largo del tratamiento dietético. Los datos se expresan como la media ± ESM (n=12-18 animales/grupo). *p<0.05; **p<0.01 y ***p<0.001 con respecto a su control (test de Newman Keuls). LF, dieta control. HF, dieta rica en grasas. TAL, tejido adiposo lumbar. TAM, tejido adiposo mesentérico. HIG, hígado y COR, corazón

5.- Cuantificación de los parámetros plasmáticos

Respecto a los parámetros plasmáticos analizados, la dieta HF i) aumentó los niveles de insulina y de glucosa tras 16 y 32 semanas, ii) aumentó los triglicéridos tras 16 semanas y iii) disminuyó los ácidos grasos libres no esterificados (NEFA) tras 16 y 32 semanas de tratamiento dietético (Ver tabla 2).

Respecto a las adipocinas liberadas por el tejido adiposo, la dieta HF aumentó la concentración plasmática de leptina tras 8, 16 y 32 semanas (Tabla 2). En todos los casos se detectó una correlación positiva entre la concentración plasmática de leptina y la cantidad de tejido adiposo lumbar y mesentérico (Figura 5). La adiponectina, por el contrario, se mantuvo sin cambios hasta la semana 32 en la que se detectó una disminución de la concentración plasmática en los animales HF (1-ANOVA $F_{(1,31)}=15.309$, *** $p<0.001$, tabla 2).

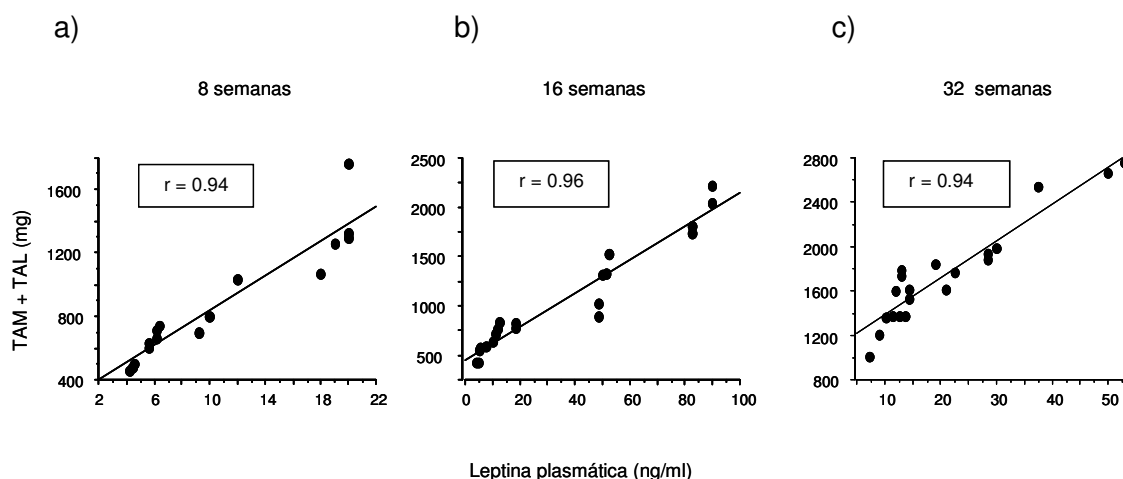


Figura 5. Correlación entre la cantidad de tejido adiposo (lumbar y mesentérico) y los niveles de leptina plasmática tras 8 (a), 16 (b) y 32 (c) semanas de dieta.
TAL, tejido adiposo lumbar; TAM, tejido adiposo mesentérico.

| | 4 sem | | 8 sem | | 16 sem | | 32 sem | |
|----------------------|--------------|-------------|--------------|----------------------|-------------|------------------------|--------------|------------------------|
| | Low fat | High fat | Low fat | High fat | Low fat | High fat | Low fat | High fat |
| Insulina (µg/L) | 0.75 ± 0.07 | 0.98 ± 0.09 | 0.77 ± 0.06 | 1.01 ± 0.1 | 0.70 ± 0.02 | 4.80 ± 0.6 *** | 2.10 ± 0.3 | 5.81 ± 0.62 *** |
| Glucosa (mg/dl) | 148.5 ± 12.4 | 157.7 ± 4.3 | 146.7 ± 11.3 | 154.8 ± 9.4 | 155.7 ± 3.5 | 171.8 ± 4.7 * | 191.5 ± 28.4 | 236.9 ± 25.3 * |
| TGs (mg/dl) | 85.2 ± 10.6 | 65.4 ± 6.2 | 64.1 ± 6.0 | 69.5 ± 3.6 | 52.3 ± 5.4 | 62.9 ± 7.9 *** | 79.6 ± 3.6 | 81.5 ± 3.0 |
| NEFA (mM) | 0.78 ± 0.06 | 0.67 ± 0.02 | 0.77 ± 0.08 | 0.64 ± 0.10 | 0.47 ± 0.05 | 0.33 ± 0.03 *** | 0.60 ± 0.04 | 0.50 ± 0.02 * |
| Leptina (ng/ml) | 6.4 ± 0.8 | 8.8 ± 3.9 | 5.4 ± 0.3 | 16.0 ± 1.7 ** | 8.1 ± 1.4 | 57.0 ± 10.3 *** | 13.6 ± 2.0 | 28.4 ± 6.1 * |
| Adiponectina (µg/ml) | --- | --- | 17.0 ± 1.9 | 17.0 ± 1.5 | 16.0 ± 1.0 | 15.1 ± 0.5 | 9.9 ± 0.4 | 7.8 ± 0.4 ** |

Tabla 2. Determinaciones plasmáticas a lo largo del tratamiento dietético. Los datos se expresan como la media ± ESM (n=8-10 animales/grupo). *p<0.05; **p<0.01 y ***p<0.001 con respecto a su control (*test de Newman Keuls*). TGs, triglicéridos; NEFA, ácidos grasos no esterificados.

6.- Cuantificación de lípidos en el tejido adiposo mesentérico, el hígado y el corazón

El contenido lipídico total en el tejido adiposo mesentérico fue mayor en los animales HF aunque sólo se detectaron diferencias significativas a las 8 semanas de dieta HF (Tabla 3). En el hígado, el contenido lipídico fue significativamente mayor tras 16 (1-ANOVA $F_{(1,15)}=7.873$, $***p<0.001$) y 32 (1-ANOVA $F_{(1,13)}=13.871$, $***p<0.001$) semanas de dieta HF (Tabla 3).

| mg lípidos/g tej | Tejido adiposo mesentérico | | |
|------------------|----------------------------|---------------|--------------|
| | 8 sem | 16 sem | 32 sem |
| <i>Low fat</i> | 449.5 ± 44.1 | 558.3 ± 134.0 | 524.2 ± 73.5 |
| <i>High fat</i> | 624.2 ± 48.6 * | 738.4 ± 56.3 | 584.9 ± 36.8 |

| mg lípidos/g tej | Hígado | | |
|------------------|-------------|-------------------------|-------------------------|
| | 8 sem | 16 sem | 32 sem |
| <i>Low fat</i> | 72.6 ± 1.5 | 83.8 ± 5.7 | 82.3 ± 10.8 |
| <i>High fat</i> | 56.9 ± 11.3 | 180.4 ± 20.2 *** | 252.3 ± 12.7 *** |

Tabla 3. Contenido lipídico en el tejido adiposo mesentérico e hígado. Los datos representan la media ± ESM de lípidos totales (mg) respecto al peso del tejido (g) (n=12-18 animales/ grupo), * $p<0.05$; ** $p<0.01$ (*test de Newman Keuls*).

El contenido de TG en el corazón fue mayor en los animales HF de 4 semanas (1-ANOVA, $F_{(1,24)}=4197$ * $p<0.05$). Esta variación no se volvió a observar en las semanas posteriores (Tabla 4).

| mg TG/g tej | Corazón | | | |
|-----------------|---------------------|------------|------------|------------|
| | 4 sem | 8 sem | 16 sem | 32 sem |
| <i>Low fat</i> | 18.3 ± 2.4 | 32.9 ± 4.9 | 28.8 ± 5.5 | 33.5 ± 3.6 |
| <i>High fat</i> | 25.9 ± 2.8 * | 29.0 ± 5.1 | 31.1 ± 5.5 | 27.9 ± 2.7 |

Tabla 4. Contenido de triglicéridos cardiacos. Los datos representan la media ± ESM de los TG (mg) respecto al peso del tejido (g) (n=6-8 animales/grupo). * $p<0.05$ (*test de Newman Keuls*).

7.- Respuesta a leptina. Fosforilación de la STAT-3 en el hipotálamo y en tejidos periféricos

La respuesta a leptina se evaluó midiendo el grado de fosforilación de la STAT-3 en respuesta a una administración de leptina aguda. Para ello, los animales se dividieron en dos subgrupos. A uno de ellos se le administró una dosis aguda de leptina (ip 1 mg/kg) y al otro una dosis de suero fisiológico. La fosforilación de la STAT-3 se determinó en el hipotálamo, el tejido adiposo lumbar, el hígado y el corazón tras 4, 8, 16 y 32 semanas de tratamiento dietético.

Hipotálamo

La administración de leptina sólo aumentó la fosforilación de la STAT-3 en hipotálamo tras 8 semanas de dieta en el grupo LF (* $p < 0.05$, figura 6). En el grupo HF, por el contrario la administración de leptina no produjo efecto alguno sobre la STAT-3, indicando la aparición de resistencia a leptina hipotalámica.

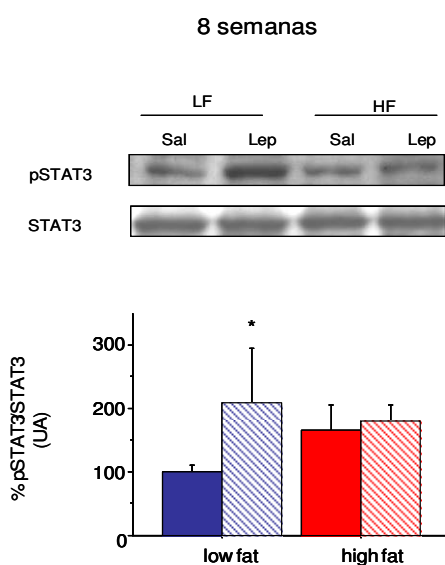


Figura 6. Efecto de la dieta tras la administración de leptina sobre el grado de fosforilación de la STAT-3 en hipotálamo tras 8 semanas. La figura superior muestra un *blot* representativo de los experimentos realizados. La figura inferior muestra el análisis cuantitativo de la señal. En color azul se representa la dieta LF. En color rojo, la dieta HF. La barra rellena representa el grupo salino, la rallada, el grupo leptina. Los valores se representan como la media \pm E.S.M (n=4-6 animales/grupo) del porcentaje de inmunorreactividad con respecto al control (* $p < 0.05$; *test de Newman Keuls*).

Tejido adiposo lumbar

La administración de leptina aumentó la fosforilación de la STAT-3 en el tejido adiposo lumbar tanto en el grupo LF como HF tras 8 semanas de dieta (Figura 7a, 2-ANOVA $F_{(1,14)}=10,612$, $p<0,01$, para el tratamiento con leptina; $F_{(1,14)}=0,044$, $p<0,05$, para la interacción entre la leptina y el tipo de dieta). Sin embargo, después de 16 semanas de dieta, la administración de leptina no modificó el grado de fosforilación en ninguno de los grupos (Figura 7b).

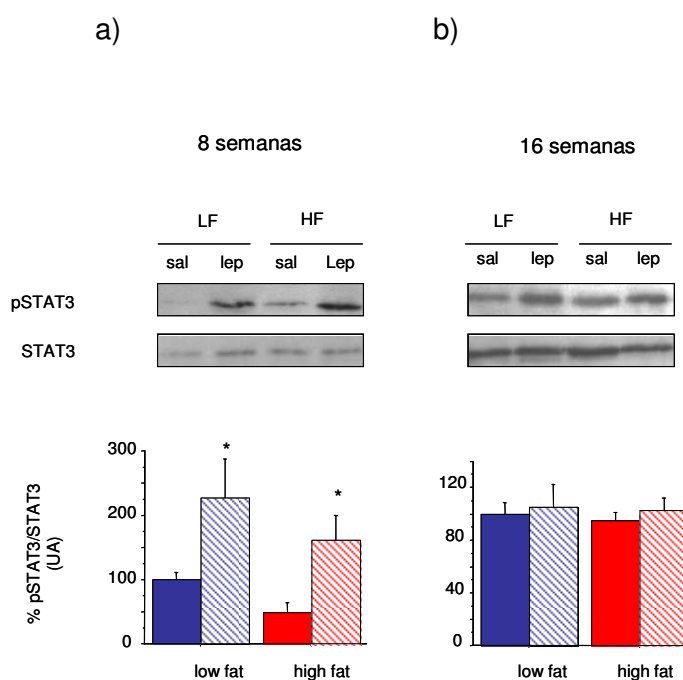


Figura 7. Efecto de la dieta tras la administración de leptina sobre el grado de fosforilación de la STAT-3 en tejido adiposo lumbar (TAL) tras 8 (a) y 16 (b) semanas de dieta. La figura superior muestra un *blot* representativo de los experimentos realizados. La figura inferior muestra el análisis cuantitativo de la señal. En color azul se representa la dieta LF. En color rojo, la dieta HF. La barra rellena representa el grupo salino, la rallada, el grupo leptina. Los valores se representan como la media \pm E.S.M ($n=4-6$ animales/grupo) del porcentaje de inmunoreactividad con respecto al control (* $p<0,05$; *test de Newman Keuls*).

Hígado

La administración de leptina aumentó la fosforilación la STAT-3 en hígado en ambos grupos tras 8 semanas de dieta (2-ANOVA $F_{(1,14)} = 8,708$, $*p < 0,05$, figura 8a). Transcurridas 16 semanas de dieta, sólo se modificó el grado de fosforilación de la STAT-3 en el grupo LF (2-ANOVA $F_{(1,12)} = 4,73$, $*p < 0,05$ para la interacción entre el tratamiento con leptina y el tipo de dieta, figura 8b). Sin embargo, tras 32 semanas, tampoco se detectó fosforilación de la STAT-3 en el grupo LF (Figura 8c).

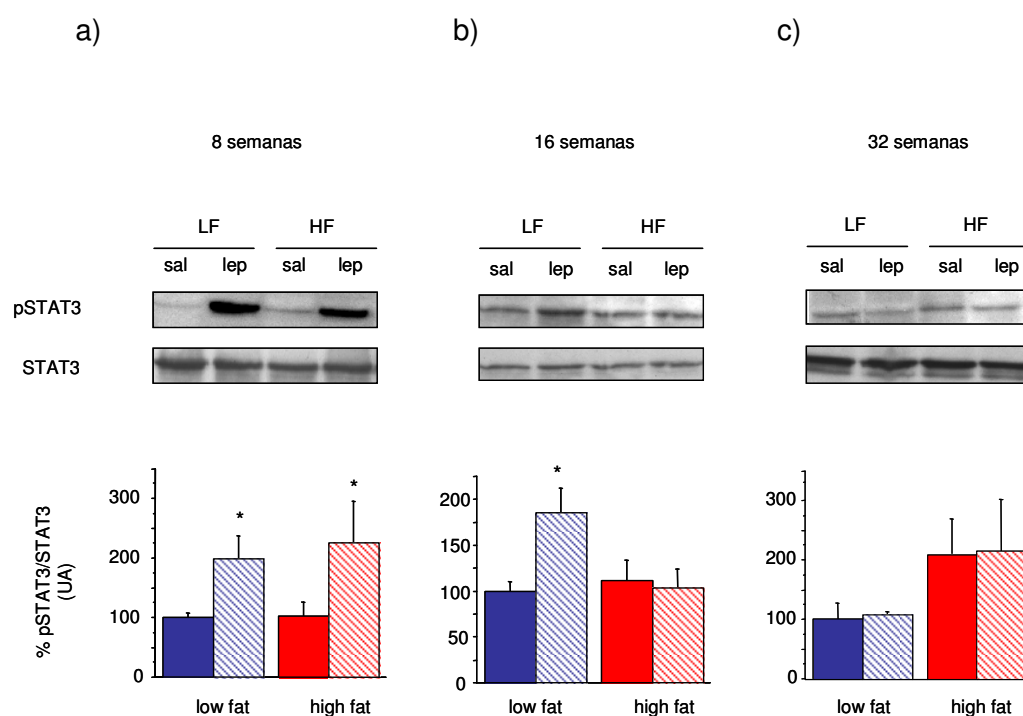


Figura 8. Efecto de la dieta tras la administración de leptina sobre el grado de fosforilación de la STAT-3 en hígado tras 8 (a), 16 (b) y 32 (c). La figura superior muestra un *blot* representativo de los experimentos realizados. La figura inferior muestra el análisis cuantitativo de la señal. En color azul se representa la dieta LF. En color rojo, la dieta HF. La barra rellena representa el grupo salino, la rallada, el grupo leptina. Los valores se representan como la media \pm E.S.M (n=4-6 animales/grupo) del porcentaje de inmunorreactividad con respecto al control ($*p < 0.05$; *test de Newman Keuls*).

Corazón

La administración de leptina incrementó la fosforilación de la STAT-3 en corazón en ambos grupos después de 8 semanas de dieta (2-ANOVA $F_{(1,11)}=8799$; $p<0,05$, figura 9a). A diferencia del resto de los tejidos analizados, la respuesta a leptina se mantuvo hasta las 32 semanas de tratamiento, observándose un incremento en el grado de fosforilación de la STAT-3 en los animales con leptina tanto en el grupo LF como HF (2-ANOVA $F_{(1,18)}= 5,697$ * $p<0,05$, figura 9b).

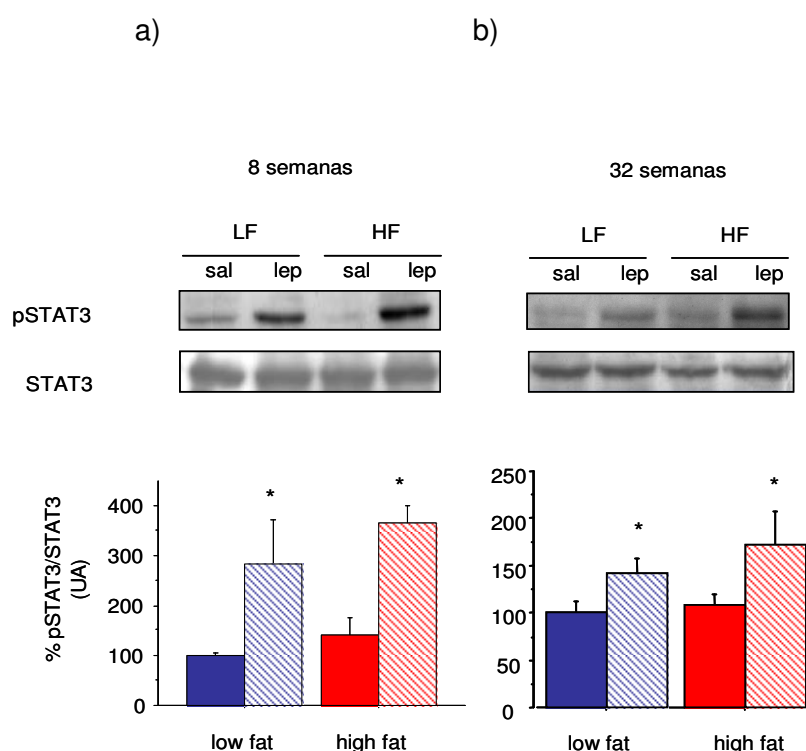


Figura 9. Efecto de la dieta tras la administración de leptina sobre el grado de fosforilación de la STAT-3 en corazón tras 8 (a) y 32 (b) semanas de dieta. La figura superior muestra un *blot* representativo de los experimentos realizados. La figura inferior muestra el análisis cuantitativo de la señal. En color azul se representa la dieta LF. En color rojo, la dieta HF. La barra rellena representa el grupo salino, la rallada, el grupo leptina. Los valores se representan como la media \pm E.S.M ($n=4-6$ animales/grupo) del porcentaje de inmunorreactividad con respecto al control (* $p<0.05$; *test de Newman Keuls*).

DISCUSIÓN

Aunque son muchos los estudios realizados en modelos animales de obesidad inducida por dieta (DIO), hasta el momento no ha habido ninguno que realice un seguimiento longitudinal desde los estadios iniciales hasta la edad adulta. Por ello, nuestro primer objetivo ha sido caracterizar la evolución del modelo DIO.

En primer lugar analizamos la evolución del peso corporal así como la evolución del tejido adiposo (lumbar y mesentérico), del hígado y del corazón. Como se observa en la figura 1 el peso corporal de los animales HF aumentó significativamente tras 2 semanas de dieta, manteniéndose así a lo largo de todo el tratamiento. Este aumento de peso no se debió a una mayor ingesta calórica, sino a la composición de la dieta (Ver figuras 2a y 2b) que le aporta a la dieta HF una mayor eficiencia calórica (Figura 3). Estos datos coinciden con trabajos realizados en condiciones similares por otros autores (Van Heek et al., 1997; Surwit et al., 1995). Este aumento de peso coincidió con un incremento del peso absoluto de los tejidos adiposos (Tabla 1), siendo éste mayor en los estadios iniciales que en los estadios finales. Así, mientras el tejido adiposo lumbar aumentó un 223% en los animales HF de 8 semanas respecto a su control LF, en los animales HF de 32 semanas el aumento fue del 29% respecto al LF. El tejido adiposo mesentérico alcanzó su máximo peso tras 16 semanas de dieta HF, 52%, y siendo tan solo del 15% tras 32 semanas de dieta HF en relación al LF. Estas variaciones coincidieron con la variación en la concentración de lípidos en el mismo (Ver tabla 3). Por otro lado, la disminución del peso relativo del tejido adiposo y su menor capacidad para acumular los lípidos se relaciona con un aumento del peso relativo del hígado y de su contenido lipídico, que aumenta desde la semana 16 de dieta HF hasta el final del tratamiento (Ver figura 4 y tabla 3). El corazón por el contrario, sólo presentó un aumento significativo de su peso tras 4 semanas de dieta HF, que coincidió con un aumento en la concentración de TG cardiacos. Ambos parámetros se normalizaron después de 8 semanas y se mantuvieron sin cambios hasta el final del tratamiento (Ver tablas 1 y 4). Estos resultados coinciden con la teoría de que los adipocitos presentan una capacidad de almacenamiento limitada y que la exposición prolongada a una dieta HF condiciona dicha capacidad favoreciendo la captación de AG por otros tejidos como el hígado, el músculo esquelético y el corazón causando esteatosis y favoreciendo la aparición de resistencia a insulina (Hausman et al., 2001; Frayn 2002; Unger 2003).

En cuanto a la bioquímica plasmática cabe resaltar la hiperleptinemia detectada en los estadios iniciales (8 semanas) y que aumenta significativamente a lo largo de todo el tratamiento, manteniéndose proporcional al aumento de tejido adiposo (figuras 5a-c). El resto de parámetros no sufrieron variaciones hasta la semana 16 cuando se detectó hiperinsulinemia e hiperglicemia en los animales HF, que perdura al cabo de 32 semanas, y que podría estar relacionado con la aparición de resistencia a insulina. Por el contrario, la dieta HF no incrementó los NEFA ni los TG. De hecho, los NEFA se encuentran disminuidos en el grupo HF de 16 y 32 semanas, lo que resulta paradójico ya que se ha descrito que en la resistencia a insulina existe un aumento de los NEFA (Lafontan, 2005; McGarry, 2002). Estudios preliminares llevados a cabo por nuestro grupo de investigación han evidenciado un cambio en el patrón de ingesta en los animales HF respecto a los LF, que sugiere un periodo postprandrial más largo en el animal HF. Este mayor periodo postprandrial coincide con un aumento de los niveles de insulina en el grupo HF que puede favorecer la resistencia a dicha hormona.

El tejido adiposo no sólo contribuye a tamponar el exceso de lípidos sino que también sintetiza hormonas, como la leptina y la adiponectina que favorecen el catabolismo de los AG en tejidos no adiposos, evitando su acumulación. Así, se ha descrito que la hiperleptinemia inducida en roedores previene la acumulación ectópica de lípidos en páncreas o en corazón (Unger et al., 1999; Lee et al 2004; Unger 2005), mientras que ratones con déficit de leptina, o con resistencia a la misma, desarrollan lipotoxicidad (Lee et al., 2001; Unger 2003). En este contexto, resulta interesante resaltar la relación entre la normalización del peso del corazón y de su contenido en TG con la hiperleptinemia detectada en el grupo HF de 8 semanas. Sin embargo, este hecho no se observa en el hígado donde la hiperleptinemia no parece prevenir la esteatosis hepática. Nuestro grupo ha descrito que la resistencia a leptina es dependiente del tejido, desarrollándose antes en unos tejidos que en otros (Somoza et al., 2007). Puesto que está descrito que la resistencia a leptina se asocia con la esteatosis, tratamos de establecer una posible relación entre la aparición de dicha resistencia y la acumulación de lípidos en distintos tejidos, con el fin de comprender por qué el aumento de lípidos se produce en determinados tejidos, como el hígado y no en otros, como el corazón. Para ello se evaluó la respuesta a leptina en hipotálamo, tejido adiposo lumbar, hígado y corazón cuantificando la fosforilación de la STAT-3 (pSTAT-3) tras la administración de una dosis aguda de leptina. Como muestran los resultados, la leptina no incrementó la p-STAT-3 en el hipotálamo de animales HF de 8 semanas (Figura 6), indicando la aparición de resistencia central a leptina ya en el inicio del desarrollo DIO (Somoza et al., 2007). Contrariamente a lo observado en hipotálamo, 8 semanas de dieta HF no

afectaron a la p-STAT-3 en el tejido adiposo, el hígado o el corazón (Figuras 7a, 8a y 9a). No ocurrió lo mismo tras 16 semanas de dieta HF, donde ya se observó una pérdida de fosforilación de STAT-3 en tejido adiposo lumbar y en hígado (Figuras 7b y 8b). Por el contrario, la fosforilación de la STAT-3 se mantuvo en corazón incluso después de 32 semanas de dieta HF (Figura 9b). Estos resultados no implican necesariamente una pérdida de funcionalidad del receptor de leptina, sino una desensibilización de la vía Jak/STAT-3, que sería compatible con la activación de otras vías alternativas (Frühbeck, 2006). También es interesante resaltar que la STAT-3 no se fosforiló en el tejido adiposo de animales LF de 20 semanas (correspondientes a 16 semanas de dieta, figura 7b), ni tampoco en el hígado de animales de 36 semanas de edad (correspondientes a 32 semanas de dieta, figura 8c) sugiriendo que la relevancia de esta vía podría disminuir también con la edad. En cualquier caso, nuestros datos muestran que la respuesta a leptina se deteriora gradualmente con la edad y en función del tejido estudiado. Igualmente hay que resaltar la relación que se produce entre la pérdida de respuesta a leptina, la menor acumulación de grasa en el tejido adiposo y el mayor incremento de lípidos en el hígado. La relación entre la resistencia a leptina en tejido adiposo y la disminución de la concentración de lípidos en dicho tejido puede deberse a una limitación en la capacidad del adipocito para aumentar de tamaño (Chen et al., 1996; Frühbeck et al., 1998). En el hígado, la resistencia a leptina se acompaña de un aumento de la masa hepática y del contenido lipídico (Fishman et al., 2007). No obstante, no hay que olvidar que este modelo animal desarrolla hiperinsulinemia y resistencia a insulina, y que los resultados obtenidos también pueden ser consecuencia de una resistencia a insulina. De hecho, la resistencia a insulina en el tejido adiposo se asocia con un descenso en la captación de TG (Riemens et al., 2000) y con la acumulación de lípidos en hígado y músculo esquelético (Goto et al., 1995; Ryysy et al., 2000; Kim et al., 2008). No obstante, la resistencia a insulina en estos animales se desarrolla al poco tiempo de empezar el tratamiento dietético siendo detectable tras 3 semanas de dieta HF en tejido adiposo, hígado y músculo esquelético de roedores (Park et al., 2005). Por todo ello, parece obvio pensar que la reducción de lípidos observada en el tejido adiposo así como el aumento de los mismos en hígado, no sólo se deba a la aparición de resistencia a insulina, y que la resistencia a leptina también podría estar implicada. En cualquier caso, la relación entre la esteatosis hepática y la pérdida de señalización de la vía STAT-3 acoplada al receptor de leptina en hígado, debe ser objeto de estudios complementarios. De cualquier modo, los resultados obtenidos sugieren que, en el modelo DIO, el hígado actúa como órgano tamponador del exceso de AG cuando el tejido adiposo ha sobrepasado su capacidad para almacenar los mismos. Este resultado permite

especular sobre una posible redistribución lipídica que iría desde el tejido adiposo hacia el hígado en estadios avanzados de DIO y que podría llevar al desarrollo de esteatosis hepática. De hecho, en clínica ya se ha observado que la acumulación de TG hepáticos es mejor indicador de complicaciones metabólicas asociadas a la obesidad que el aumento del tejido adiposo visceral (Fabrinni et al., 2009).

Los resultados más relevantes de nuestro estudio son: i) el corazón no llega a acumular TG tras 32 semanas de dieta HF y ii) la posible implicación de la leptina en dicho fenómeno. Nuestro equipo ha demostrado en un estudio previo que en estadios iniciales (8 semanas) del desarrollo de DIO se produce una adaptación del metabolismo cardiaco que favorece la oxidación de los AG gracias al desacoplamiento mitocondrial y a la fosforilación de la AMPK (Somoza et al., 2007). En humanos, la esteatosis cardiaca es una condición conocida en pacientes con obesidad mórbida y diabetes (McGavoc et al., 2006; McGavoc et al., 2007), aunque las características clínicas no están bien descritas (Feuvray and Darmellah, 2007). Como sugiere McGavoc, el corazón humano es capaz de metabolizar convenientemente los AG durante largos periodos de ingesta elevada de grasas. Sin embargo, este sistema podría volverse inactivo después de años de continuo sustento. En cuanto al papel protector de la leptina sobre el corazón, se ha demostrado que la hiperleptinemia provocada por transfección adenovírica reduce la concentración de TG en tejidos no adiposos en ratas Zucker *fa/fa* (Shimabukuro et al., 1997). Igualmente, se han observado efectos similares en otros modelos con cardiomiopatía lipotóxica (Lee et al., 2004). Estudios previos sugieren que la hiperleptinemia derivada de las dietas HF tiene un papel importante en las adaptaciones del metabolismo cardiaco en DIO, que van dirigidas fundamentalmente a la prevención de la esteatosis cardiaca (Somoza et al., 2007; Tschöp 2007; Yang et al., 2007). Sin embargo, tampoco se conocen los mecanismos moleculares de este fenómeno.

En resumen, en este estudio hemos caracterizado el modelo DIO en ratón desde estadios iniciales (4 semanas) hasta estadios avanzados (32 semanas). También se demuestra que la ruta JaK/STAT-3 acoplada al receptor de leptina deja de ser funcional en hígado de animales HF, coincidiendo con la aparición de esteatosis hepática. Ésta coincide además, con una disminución del tamaño del tejido adiposo que sugiere que el hígado podría actuar como órgano secundario en la captación del exceso de TG plasmáticos cuando el tejido adiposo es incapaz de hacerlo.

CAPÍTULO II

METABOLISMO CARDIACO: Adaptaciones tempranas en el modelo DIO

METABOLISMO CARDIACO: adaptaciones tempranas del modelo DIO

INTRODUCCIÓN

En condiciones normales, el tejido adiposo es capaz de almacenar una pequeña parte de la energía ingerida en forma de TG, para constituir un reservorio energético capaz de hacer frente a situaciones que requieran un aporte de energía, como el ayuno o el ejercicio prolongado. Los tejidos no adiposos como el hígado o el músculo esquelético presentan una capacidad limitada para almacenar lípidos. Sin embargo, cuando el aporte de grasas en la dieta es elevado y esta situación se prolonga en el tiempo, la grasa puede acumularse en dichos tejidos dando lugar a la aparición de hígado graso, resistencia a insulina, disfunción pancreática o cardiomiopatías (Unger, 2003). El organismo cuenta con mecanismos adaptativos capaces de hacer frente a la sobrecarga lipídica como son la termogénesis y el incremento de la β -oxidación. La termogénesis se lleva a cabo a través de las proteínas desacoplantes (UCP) que reducen la formación de ATP y facilitan la liberación de energía en forma de calor. La β -oxidación está regulada principalmente por la proteínquinasa dependiente de AMP (AMPK). Ambos mecanismos contribuyen a prevenir la esteatosis y la lipotoxicidad. Su correcto funcionamiento es crucial para comprender las alteraciones metabólicas que van ligadas al desarrollo de obesidad (Zhou et al., 1997; Shimabukuro et al., 1997; Wang et al., 1999; Unger et al., 1999; Lee et al., 2004; Unger 2005).

El consumo de dietas ricas en grasas (HF) induce sobrepeso y aumento del tejido adiposo (modelo de obesidad inducida por dieta, DIO) en roedores. En estos animales también se ha detectado un aumento de los niveles plasmáticos de leptina en estadios iniciales del desarrollo de DIO (Van Heek et al., 1997). Además de su efecto saciante, la leptina favorece la oxidación de los AG y limita la lipogénesis. La leptina también induce la expresión de UCPs en diferentes tejidos como el tejido adiposo marrón (Scarpace and Matheny, 1998) o el páncreas (Zhou et al., 1997). Estos datos evidencian un papel importante de dicha hormona en el control del metabolismo energético. Igualmente, numerosos trabajos llevados a cabo en roedores con hiperleptinemia por modificación génica sugieren que la leptina puede limitar la acumulación ectópica y proteger a los tejidos no adiposos de la lipotoxicidad (Chen et al., 1996; El-Haschimi et al., 2000; Unger 2003; Münzberg et al., 2004; Unger 2005;). Sin embargo la hiperleptinemia prolongada también va asociada a un desarrollo progresivo de resistencia a leptina, originada principalmente en hipotálamo (Van Heek et al., 1997;

El-Haschimi et al., 2000; Münzberg et al., 2004) como consecuencia de una desensibilización de receptores de leptina o de un menor paso de leptina al cerebro. Como se describía en el capítulo anterior, la dieta HF también causa resistencia a leptina tejido-dependiente ya que va apareciendo gradualmente en los diferentes tejidos. Primeramente, aparece resistencia hipotalámica y posteriormente, en tejidos periféricos como el tejido adiposo y el hígado. En el corazón por el contrario no se ha detectado resistencia a leptina tras el consumo de dieta HF durante 32 semanas (ver capítulo 1).

Nuestra hipótesis es que el consumo de dietas HF podría desencadenar una serie de mecanismos encaminados a estimular el desacoplamiento mitocondrial y la β -oxidación cardiaca. Además, la hipótesis contempla el posible papel cardioprotector de la leptina. Para llevar a cabo estos objetivos se utilizaron ratones macho de la cepa C57BL/6J a los que se les administró una dieta control, que contenía el 10% de las calorías procedentes de grasas saturadas (*low fat*, LF), y una dieta rica en grasas, que contiene el 45% de las calorías procedentes de grasas saturadas (*high fat*, HF) durante 4, 8 y 16 semanas. En el corazón de dichos animales se determinó: i) la expresión de la UCP-2, ii) el grado de fosforilación de la AMPK (pAMPK), iii) el contenido de lactato así como la actividad lactato deshidrogenasa, y iv) la respuesta del corazón a leptina cuantificando el grado de fosforilación de la STAT-3 tras la administración aguda de leptina (1 mg/kg, intraperitoneal)

RESULTADOS

1.- Evolución del peso corporal, los tejidos y el contenido graso de los mismos

Como ya se ha descrito en el capítulo I de la presente memoria, la dieta HF aumentó el peso corporal tras 4, 8 y 16 semanas. Ese incremento se tradujo en un incremento de los tejidos adiposos lumbar y mesentérico a lo largo del tratamiento dietético (ver figura 1 y tabla 1, capítulo I). Sin embargo, es interesante resaltar que el peso del corazón sólo aumentó significativamente tras 4 semanas de dieta HF (LF= 118.1 ± 3.3 vs HF= 138.6 ± 4.9 ***; 1-ANOVA, $F_{(1,14)}=9331$; $p<0.001$). Este aumento inicial del peso de corazón coincidió con un incremento en el contenido de TG cardiacos (LF= 18.3 ± 2.4 , HF= $25.9 \pm 2.8^*$; 1-ANOVA, $F_{(1,24)}=4197$ $p<0.05$).

2.- Detección de la UCP-2 en corazón

Tal como se muestra en la figura 10a, tras 4 semanas de dieta HF la expresión de UCP-2 no se modificó, sin embargo, tras 8 semanas se observó un incremento en la expresión de la misma en los animales HF (1-ANOVA, $F_{(1,14)}=7912$, $p<0,05$, figura 10b). Dicho aumento de expresión se perdió tras 16 semanas de tratamiento (Figura 10c).

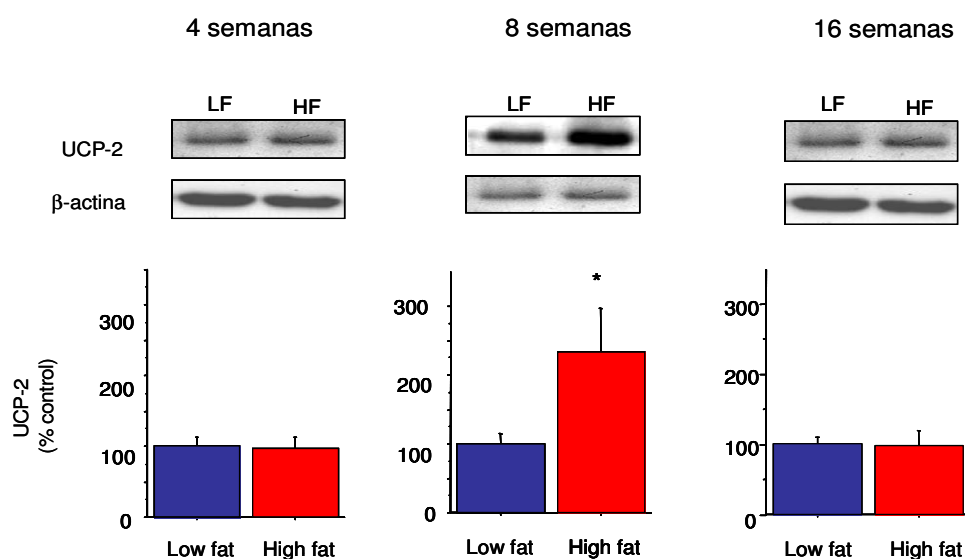


Figura 10. Efecto de la dieta sobre la expresión de la UCP-2 cardiaca tras 4, 8 y 16 semanas de tratamiento dietético. La figura superior muestra un *blot* representativo de los experimentos realizados. La figura inferior muestra el análisis cuantitativo de las señales. El color azul representa la dieta control LF y el color rojo, la dieta HF. Los valores se representan como la media \pm E.S.M (n=6-8 animales/grupo) del porcentaje de inmunorreactividad con respecto al control. (* $p<0.05$, test de *Newman Keuls*).

Esta mayor expresión de UCP-2 cardiaca correlacionó positivamente con la concentración de leptina plasmática (Figura 11a) en los animales HF de 8 semanas ($F_{(1,6)}=60.658$; $p<0.01$; $r = 0.96$). También se detectó una correlación positiva entre la expresión de la UCP-2 y la cantidad de tejido adiposo lumbar ($F_{(1,14)}=53.425$; $p<0.001$, Figura 11b) en dichos animales.

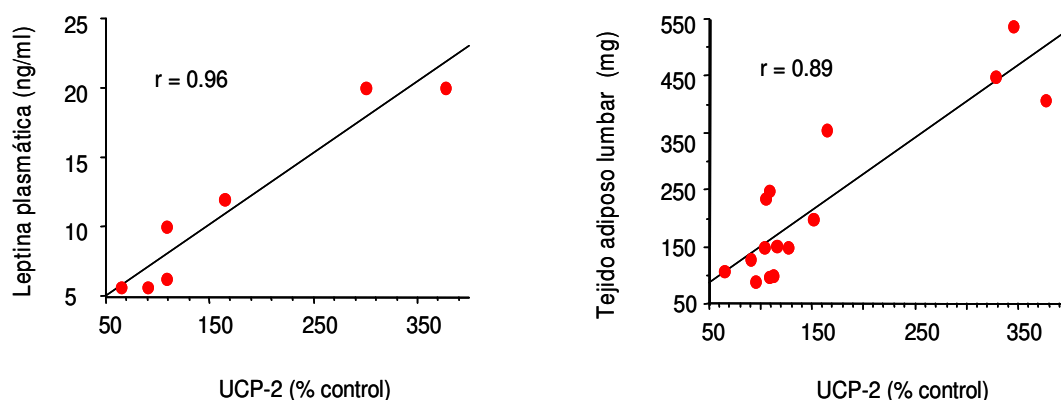


Figura 11. a) Correlación entre la concentración de leptina plasmática y la expresión de la UCP-2, b) correlación entre la cantidad de TAL y la expresión de la UCP-2. Los datos representan al grupo HF de 8 semanas ($n= 7-12$).

3.- Cuantificación de la concentración de ATP en corazón

No se observaron diferencias en los niveles de ATP en corazón entre ambos grupos tras 4, 8 o 16 semanas de dieta (Tabla 5).

| | nmoles ATP/g prot | |
|------------|-------------------|---------------|
| | Low fat | High fat |
| 4 semanas | 1.15 ± 0.25 | 1.31 ± 0.35 |
| 8 semanas | 0.058 ± 0.013 | 0.058 ± 0.011 |
| 16 semanas | 0.47 ± 0.07 | 0.33 ± 0.03 |

Tabla 5. Contenido de ATP cardiaco. Los datos representan la media ± ESM de los nmoles de ATP respecto a los g de proteína del tejido ($n=6-8$ animales/grupo). * $p<0.05$ (test de Newman Keuls).

4.- Detección de pAMPK y AMPK (*AMP-activated protein kinase*)

No se detectaron cambios en la fosforilación de la AMPK (pAMPK) tras 4 semanas de dieta HF. Por el contrario, después de 8 semanas de dieta, el grupo HF presentó una mayor fosforilación de la enzima que el grupo control LF (1-ANOVA, $F_{(1,13)}=6361$; $p < 0.01$). Sin embargo, después de 16 semanas de tratamiento dietético, no se detectaron diferencias en la fosforilación de la AMPK entre los grupos (Figura 12).

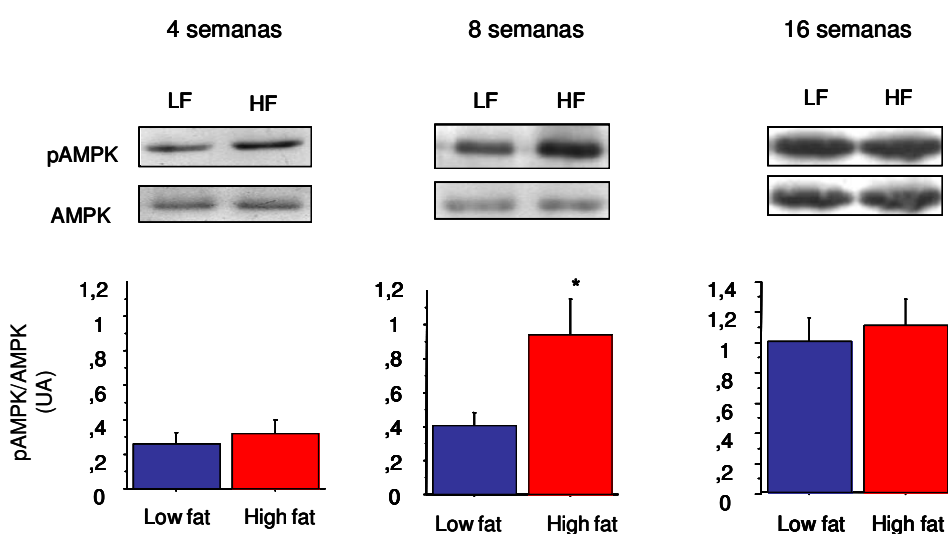


Figura 12. Determinación del pAMPK/AMPK en corazón tras 4, 8 y 16 semanas de tratamiento dietético. La figura superior muestra un *blot* representativo de los experimentos realizados. La figura inferior muestra el análisis cuantitativo de las señales. En color azul se representa la dieta control (*low fat*). En color rojo, la dieta rica en grasas (*high fat*). Los valores se representan como la media \pm E.S.M ($n=6-8$ animales/grupo) del porcentaje de inmunorreactividad. * $p < 0.05$ (test de *Newman Keuls*).

5.-Determinación de la concentración de lactato y de la actividad lactato deshidrogenasa (LDH) en corazón

Como ilustra la figura 13, la concentración de lactato en corazón fue mayor en el grupo HF después de 4 semanas de tratamiento dietético (1-ANOVA, $F_{(1,32)}=10.035$; $p<0.01$). Dicho incremento se acompañó de una mayor actividad LDH (1-ANOVA, $F_{(1,31)}=6749$; $p<0.05$). Por el contrario, después de 8 semanas se observó una disminución de lactato en el grupo HF así como una disminución de la actividad LDH (1-ANOVA, $F_{(1,31)}=6749$; $p=0,058$). Los niveles de lactato en corazón no presentaron diferencias significativas a las 16 semanas; sin embargo la actividad LDH presentó un aumento en el grupo HF (1-ANOVA, $F_{(1,16)}= 9.832$, $p<0.001$).

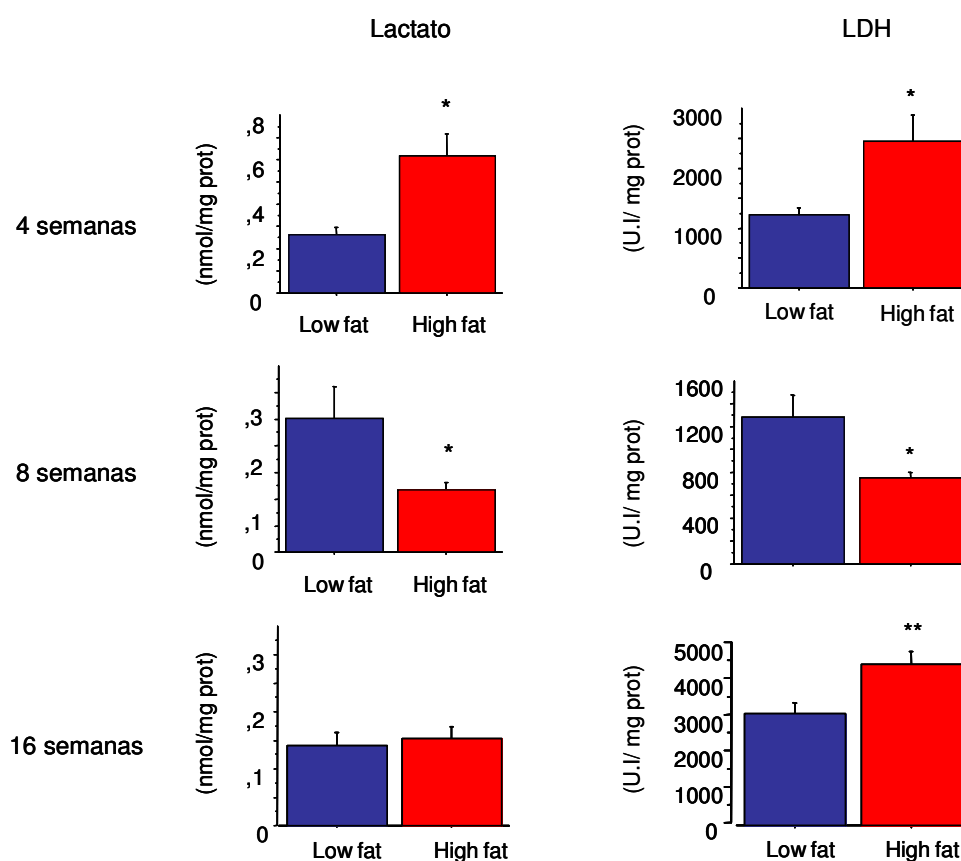


Figura 13. Concentración de lactato y actividad LDH en corazón. Las barras representan las medias \pm E.S.M. de la concentración de lactato expresada en mmol/mg de proteína, y de la actividad LDH, expresada en unidades internacionales (UI) por mg de proteína ($n=10-12$), * $p<0.05$, ** $p<0.01$ (test de Newman Keuls).

Es interesante resaltar que la concentración de lactato en el grupo HF de 8 semanas correlacionó negativamente con la expresión de UCP-2 cardiaca ($F_{(1,8)}=8.004$; $p<0.05$; $r=0.73$) en dichos animales (Figura 14a). Igualmente, se observó una correlación negativa entre la concentración cardiaca de lactato y la relación pAMPK/AMPK en el corazón del grupo HF de 8 semanas ($F_{(1,7)}=6851$; $p<0.05$; $r=0.73$) (Figura 14b).

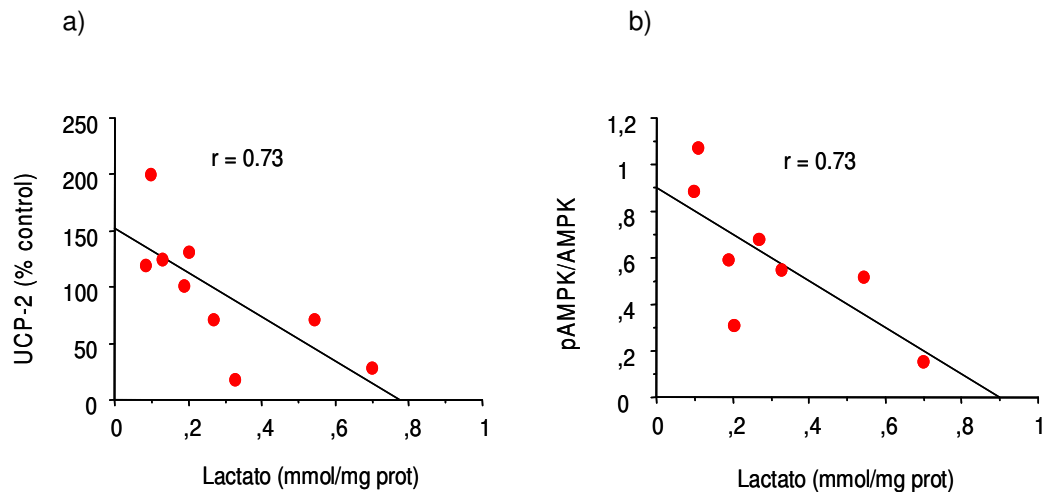


Figura 14. a) correlación entre la expresión de UCP-2 y la concentración de lactato en corazón. b) correlación entre pAMPK/AMPK y la concentración de lactato en corazón. (n= 8-10).

DISCUSIÓN

Este estudio muestra la importancia de la composición de la dieta en el metabolismo cardiaco y en los cambios que se producen en el mismo tras el consumo a corto plazo de una ingesta rica en grasas saturadas. Nuestros resultados demuestran que la dieta HF aumenta la expresión de UCP-2 y la fosforilación de la AMPK (pAMPK), favoreciendo la oxidación de los AG en detrimento de la oxidación de hidratos de carbono en corazón. Estos resultados no van ligados aparentemente a una mayor ingesta, que es similar en ambos grupos (fig 2a y 2b, capítulo I), sino que parecen estar más relacionados con la composición de la dieta. Dichos resultados coinciden con el aumento de leptina plasmática detectado en estos animales HF de 8 semanas. Aunque la obesidad se asocia con la aparición de resistencia a leptina, en el capítulo anterior demostramos que dicha aparición es tejido dependiente, ya que aparece en hipotálamo pero no en corazón tras 8 semanas de consumo de dieta HF (ver figuras 6 y 9, capítulo I). Estos resultados sugieren que la leptina podría participar en los cambios metabólicos cardiacos, independientemente de la acción central de dicha hormona.

Como se ha mencionado anteriormente, los animales HF de 8 semanas presentaron un incremento de expresión de UCP-2 en corazón tras el consumo de dieta HF. Las UCPs actúan como canales de protones que regulan el potencial de la membrana mitocondrial, regulando la entrada de protones desde el citosol hacia la matriz mitocondrial. Este efecto, en el caso de la UCP-1, se traduce en una disipación de energía en forma de calor (termogénesis); en el resto de isoformas, el papel termogénico no ha sido demostrado. La UCP-2 parece jugar un papel en el metabolismo energético por otros mecanismos. De hecho existen diversos estudios que ponen de manifiesto su papel en la β -oxidación (Zhou et al., 1997; Wang et al., 1999; Boss et al., 2000) contribuyendo a limitar la esteatosis en tejidos no adiposos (Unger 2003; Unger 2005). Así se ha observado una regulación a la baja en la expresión de UCP-2 en roedores que consumen una dieta equilibrada entre lípidos/hidratos de carbono, en relación con aquellos animales recién destetados cuya dieta materna es fundamentalmente lipídica (Lopaschuck et al., 1992). Igualmente se ha observado que el consumo de dietas ricas en grasas induce la expresión de UCP-2 cardiaca (Bachmann and Weber 1990). La leptina también parece modular la expresión de UCP-2. Así, se ha observado que en modelos de hiperleptinemia transitoria por administración de leptina exógena, la leptina modula la expresión de UCP-2 en tejido adiposo y en músculo esquelético (Sivitz et al., 1999). Igualmente, se ha detectado un aumento de la expresión de UCP-2 en ratas hiperleptinémicas por modificación génica, tanto en

adipocitos (Zhou et al, 1999) como en células β (Zhou et al, 1997). Sin embargo, otros estudios llevados a cabo en ratones *ob/ob*, que carecen de leptina, sugieren que la elevada expresión de UCP-2 detectada en el tejido adiposo de los mismos está relacionada con la ausencia de señalización de la leptina (Gimeno et al., 1997). Igualmente, tampoco se detectó un aumento de la expresión de UCP-2 en tejido adiposo de ratones *ob/ob* tras la administración de leptina exógena (Commins et al., 1999). Esta controversia sugiere que el efecto de la leptina en el control y regulación de la UCP-2 depende de las condiciones experimentales. En nuestro estudio se ha detectado una correlación positiva entre la expresión de UCP-2 cardiaca y la hiperleptinemia de los animales HF de 8 semanas (Figura 11a, $r=0.96$) sugiriendo un posible papel de la misma en el desacoplamiento mitocondrial. Por otro lado, en este estudio también se ha observado un incremento en el grado de fosforilación de la AMPK (la forma activa), una enzima clave en el control del metabolismo energético cuya activación aumenta la β -oxidación y disminuye la lipogénesis. Este hecho, junto con el incremento de la expresión de UCP-2 parecen evidenciar que el corazón de los animales HF de 8 semanas presenta un incremento de la β -oxidación que no se observa en los animales HF de 4 semanas.

En condiciones normales, los AG aportan cerca del 60% de la energía que necesita el corazón, mientras que el resto (40%) lo proporcionan los hidratos de carbono. No obstante, esta proporción depende de su concentración en sangre y del estado hormonal (Stanley y Chandler, 2002), de forma que una dieta rica en grasa favorece la β -oxidación en detrimento de la oxidación de hidratos de carbono que puede llegar a aportar sólo un 10% de la energía necesaria. Nuestros resultados muestran que dicho cambio metabólico ocurre de manera gradual. En nuestro estudio hemos observado que 4 semanas de dieta HF aumentan el contenido de lactato y la actividad lactato deshidrogenasa (LDH) en el corazón del grupo HF, mientras que 8 semanas de dieta HF disminuye ambos parámetros. En estas condiciones el contenido de lactato correlaciona negativamente con la expresión de UCP-2 cardiaca ($r=0.73$, figura 14a) y con el grado de fosforilación de la AMPK (pAMPK) (Figura 14b), en el grupo HF de 8 semanas, lo que parece corroborar la idea de que el corazón aumenta la β -oxidación en detrimento de la oxidación de hidratos de carbono. También resulta interesante resaltar que la concentración de TG cardiacos se normaliza tras 8 semanas de dieta HF (Tabla 4). Esta normalización coincide con el aumento de leptina plasmática, la fosforilación de la AMPK y la expresión de UCP-2. A pesar de no disponer de medidas directas sobre la oxidación de AG, los resultados obtenidos sugieren que, en estadios iniciales de DIO, la β -oxidación se convierte en la principal

fuerza de energía del corazón, en detrimento de la oxidación de hidratos de carbono justificando la ausencia de esteatosis cardiaca.

Está descrito que la hiperleptinemia se asocia con resistencia a leptina (Münzberg et al., 2004). Nuestros resultados sin embargo muestran que el consumo de dieta HF durante 8 semanas conlleva resistencia a leptina en hipotálamo pero no en corazón, sugiriendo que la aparición de resistencia a leptina es gradual y dependiente del tejido (Ver capítulo I figuras 6 y 9). Los estudios llevados a cabo tanto en roedores como en humanos sobre las causas de resistencia a leptina sugieren un deterioro en el paso de leptina desde la periferia hasta el cerebro más que una desensibilización de receptores de leptina. Nuestros resultados apoyan esta idea ya que los receptores cardiacos de leptina también expuestos a los niveles circulantes de leptina conservan la respuesta a la hormona mejor que los receptores hipotalámicos, tras 8 semanas de dieta HF. Todos estos datos sugieren que durante los estadios iniciales del desarrollo de DIO se produce un cambio en el metabolismo cardiaco que encamina hacia el consumo de AG en detrimento de hidratos de carbono. La ausencia de resistencia a leptina en el corazón, junto con la correlación positiva entre la leptina plasmática y la expresión de UCP-2 sugieren que este cambio podría estar mediado por leptina. El incremento de leptina plasmático que ocurre en paralelo con el aumento del tejido adiposo podría actuar como un mecanismo protector para evitar la esteatosis cardiaca. De hecho, se ha descrito que la ausencia de leptina en ratones *ob/ob* se acompaña del acumulo de TG en cardiomiocito (Christoffersen et al, 2003) y que la administración de leptina revierte dicha acumulación (Barouch et al, 2003; Unger, 2003).

En conclusión, los resultados muestran que el corazón es capaz de adaptar inicialmente su metabolismo energético ante un consumo a corto plazo (8 semanas) incrementando la expresión de UCP-2 y el grado de fosforilación de la AMPK. Sin embargo, es interesante resaltar que dichas adaptaciones metabólicas no se observan tras un consumo más prolongado de dieta HF (16 semanas) pese a que no se ha detectado tampoco acumulación de TG cardiacos. Este hecho parece corroborar la idea de que los cambios observados en este estudio son adaptaciones iniciales al desarrollo de DIO y que el consumo a más largo plazo de dieta HF requiere nuevas adaptaciones metabólicas para prevenir la esteatosis cardiaca. Por todo ello serán necesarios nuevos estudios que eluciden las adaptaciones metabólicas que tienen lugar en estadios más avanzados del desarrollo de obesidad inducida por dieta.

CAPÍTULO III

**METABOLISMO CARDIACO: Adaptaciones tardías en el modelo DIO.
Regulación de la actividad carnitin-palmitoiltransferasa cardiaca por leptina**

METABOLISMO CARDIACO: Adaptaciones tardías en el modelo DIO. Regulación de la actividad carnitin-palmitoiltransferasa cardiaca por leptina

INTRODUCCIÓN

Como ya se ha mencionado en los anteriores capítulos, las necesidades energéticas del corazón están cubiertas con la oxidación mitocondrial de los AG (β -oxidación) y, en menor medida del piruvato. La β -oxidación está regulada por el complejo carnitin-palmitoiltransferasa (CPT), que incluye la CPT-I y CPT-II (Eaton et al., 2001; Eaton, 2002). La CPT-I se inhibe por malonil-CoA. La CPT-II, por el contrario, no es sensible a malonil-CoA por lo que es posible hacer referencia a las actividades CPT-I y CPT-II como actividad CPT sensible a malonil-CoA (o CPT-I) y actividad CPT no sensible a malonil-CoA (o CPT-II). La síntesis de malonil-CoA esta regulada a su vez por la proteínquinasa dependiente de AMP (AMPK) y por la acetil-CoA carboxilasa (ACC). Su activación e inhibición depende principalmente de las necesidades energéticas (Folmes and Lopaschuk, 2007). Así, cuando los niveles de ATP disminuyen la AMPK se fosforila, la ACC se inhibe y la síntesis de malonil-CoA se bloquea favoreciendo la β -oxidación. Por el contrario, cuando los niveles de ATP son elevados, la AMPK se defosforila y la ACC se activa estimulando la síntesis de malonil-CoA que inhibe la β -oxidación y favorece la síntesis de *novo* de AG. En músculo esquelético la leptina activa la AMPK y aumenta la β -oxidación (Minokoshi et al., 2002). En el corazón sin embargo, la leptina incrementa la β -oxidación sin activar la AMPK, sugiriendo la implicación de otras vías (Atkinson et al., 2002). La AMPK también está regulada negativamente por la proteínquinasa B (Akt). Así la fosforilación de la Akt (forma activa) inhibe la AMPK en corazón de rata (Kovacic et al., 2003).

La mayor o menor captación de cada sustrato energético, AG e hidratos de carbono, dependerá del aporte de los mismos en la dieta, de la actividad física y de condiciones fisiopatológicas como la diabetes, la hipertrofia ventricular o la isquemia miocárdica crónica (Stanley et al., 2005). Igualmente, el consumo prolongado de dietas ricas en grasas incrementa la β -oxidación y reduce la oxidación de piruvato (Kerbey et al., 1976) siendo los AG casi la única fuente de energía para el corazón (Dolinsky and Dyck, 2006). En el capítulo anterior describimos que el corazón adapta su metabolismo energético incrementando la fosforilación de la AMPK y el desacoplamiento mitocondrial tras 8 semanas de dieta HF. Además, también se proponía que la leptina presenta un papel clave en este fenómeno (Somoza et al., 2007). Sin embargo dichas adaptaciones desaparecen en estadios más avanzados de DIO (Ver capítulo II,

resultados 16 semanas). En nuestro estudio hemos observado que el consumo prolongado (32 semanas) de dieta HF da lugar a una hiperleptinemia severa que se acompaña de resistencia a leptina en hipotálamo y en hígado, donde también se ha detectado esteatosis. En el corazón, sin embargo, no se ha detecta resistencia a leptina ni esteatosis, lo que podría indicar una relación entre la leptina y las adaptaciones metabólicas que previenen la esteatosis cardíaca.

Nuestra hipótesis de trabajo es que la leptina interviene en el metabolismo cardíaco de los AG modulando la acción de la CPT-I. En base a dicha hipótesis nuestro objetivo ha sido caracterizar el efecto de la hiperleptinemia sobre la actividad CPT. Para ello hemos utilizado ratones de la cepa C57BL/6J de 36 semanas de edad con hiperleptinemia inducida mediante: i) la administración de una dosis aguda de leptina (1mg/kg, ip), ii) la administración de una dieta HF durante 32 semanas.

RESULTADOS

1.- ANIMALES CON HIPERLEPTINEMIA EXÓGENA

1.1.- Determinación de la actividad carnitin-palmitoiltransferasa (CPT) y su regulación por malonil-CoA en animales hiperleptinemicos por administración de leptina exógena

En primer lugar analizamos el efecto del malonil-CoA sobre la actividad CPT en mitocondrias aisladas de animales tratados con una dosis aguda de leptina. El análisis de los resultados muestra que el malonil-CoA ($F_{(1,14)}= 18.420$; $p<0.01$) disminuyó la actividad CPT independiente de que estuvieran tratados con leptina o no ($F_{(1,44)}= 2.712$; $p<0.05$, para la interacción malonil-CoA y leptina), aunque el efecto es más marcado en los animales con leptina. La concentración inhibitoria 50 (IC_{50}) fue menor en las muestras control (control= $8.1 \pm 1.5 \mu\text{mol/l}$ vs leptina= $69.3 \pm 5.2 \mu\text{mol/l}$, $p<0.01$).

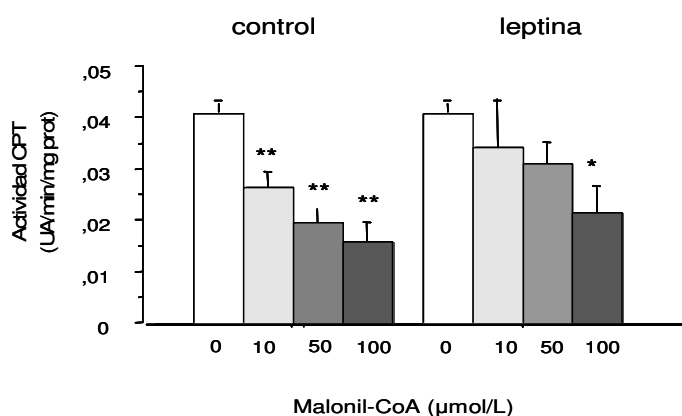


Figura 15. Efecto de la administración de leptina (1mg/kg) sobre la inhibición de la actividad de CPT cardiaca por malonil-CoA (0-100μmol/L). Las barras representan las medias \pm E.S.M. de la actividad CPT expresada en unidades arbitrarias (UA) respecto a proteína (mg), en ausencia (barra blanca) y presencia (barras grises) de malonil-CoA (10-100 $\mu\text{mol/l}$) ($n=6-8$ animales/grupo), * $p<0.05$, ** $p<0.01$ respecto a sus respectivos controles (*test de Newman Keuls*).

La concentración plasmática de leptina en el grupo control fue de 13.6 ± 1.7 ng/ml y en el grupo tratado con leptina de 81.1 ± 12.8 ng/ml (** $p<0.01$). Esta concentración plasmática de leptina correlacionó positivamente con la actividad CPT no sensible a malonil-CoA (50 $\mu\text{mol/l}$; $F_{(1,16)}= 7.387$; $p<0.05$; $r= 0.61$, figura 16). Este resultado muestra que el efecto del malonil-CoA es menor cuando la concentración plasmática de leptina es elevada.

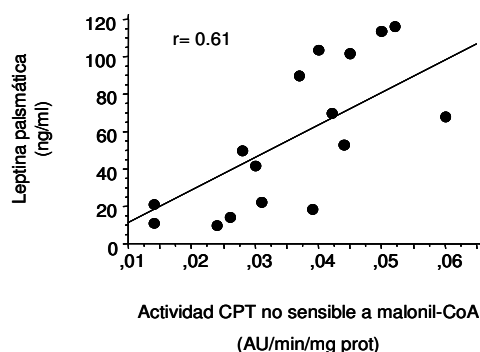


Figura 16. Correlación entre la concentración de leptina plasmática y la actividad de CPT en presencia de 50 $\mu\text{mol/L}$ malonil-CoA (CPT no sensible a malonil-CoA) en mitocondrias aisladas de corazón de animales con hiperleptinemia exógena (n= 7-12 animales).

El efecto de la leptina (10 $\mu\text{g/ml}$) también se comprobó en explantes de ventrículo, tal y como se especifica en el apartado de material y métodos. Como se observa en la figura 17, la incubación con 50 $\mu\text{mol/l}$ de malonil-CoA redujo la actividad de CPT en el control (1-ANOVA, $F_{(1,11)} = 18.984$; $p < 0.01$), pero no en el grupo leptina.

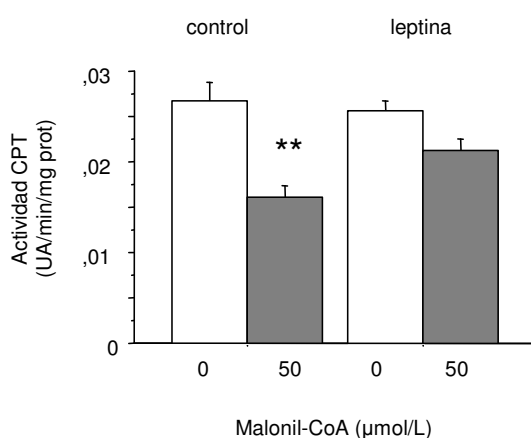


Figura 17. Efecto del malonil-CoA sobre la actividad CPT en explantes de corazón incubados con 10 $\mu\text{g/ml}$ de leptina. Las barras representan las medias \pm E.S.M. de la actividad CPT expresada en UA/min/mg de proteína, en ausencia (barra blanca) y presencia (barras grises) de malonil-CoA 50 $\mu\text{mol/L}$ (n=6-8 animales/grupo), $**p < 0.01$ respecto al grupo control (*test de Newman Keuls*).

1.2.- Señalización de leptina en corazón

A continuación se evaluó la funcionalidad del receptor de leptina analizando la vías de señalización STAT-3 y Akt, ambas acopladas al receptor de leptina. La figura 18 muestra que la administración de leptina (1 mg/kg ip), incrementó el grado de fosforilación de la STAT-3 y de la Akt en corazón (1-ANOVA, pSTAT-3 $F_{(1,17)}= 6.681$; $p<0.05$; pAkt $F_{(1,15)}= 5.297$; $p<0.05$).

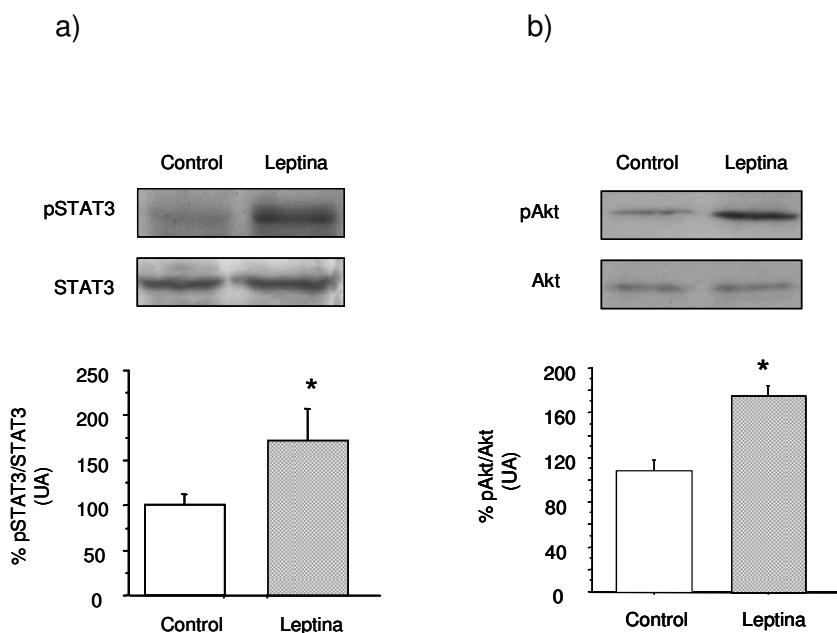


Figura 18. Efecto de la leptina (1mg/kg ip) sobre la fosforilación de la STAT-3 (a) y de la Akt (b) en corazón. La figura superior muestra un blot representativo de los experimentos realizados. La figura inferior muestra el análisis cuantitativo de las señales. La barra blanca representa el grupo control. La barra rallada gris, el grupo leptina. Los valores se representan como la media \pm E.S.M (n=8-10 animales/grupo) del porcentaje de inmunorreactividad con respecto a su control. * $p<0.05$; *test de Newman Keuls*.

El grado de fosforilación de la Akt correlacionó positivamente i) con la concentración plasmática de leptina ($F_{(1,16)}= 16.022$; $p<0.01$; $r= 0.71$, figura 19a), y ii) con la actividad de CPT no sensible a malonil-CoA ($F_{(1,15)}= 16.348$; $p<0.01$; $r= 0.67$, figura 19 b). Por otro lado, los niveles de leptina plasmáticos correlacionaron con el grado de fosforilación de la STAT-3 (pSTAT-3), sin embargo, no se observó ninguna correlación entre la pSTAT-3 y la actividad de CPT no sensible a malonil-CoA. Estos resultados sugieren que el efecto de la leptina sobre la sensibilidad de CPT a malonil-CoA estaría mediado por la fosforilación de la Akt.

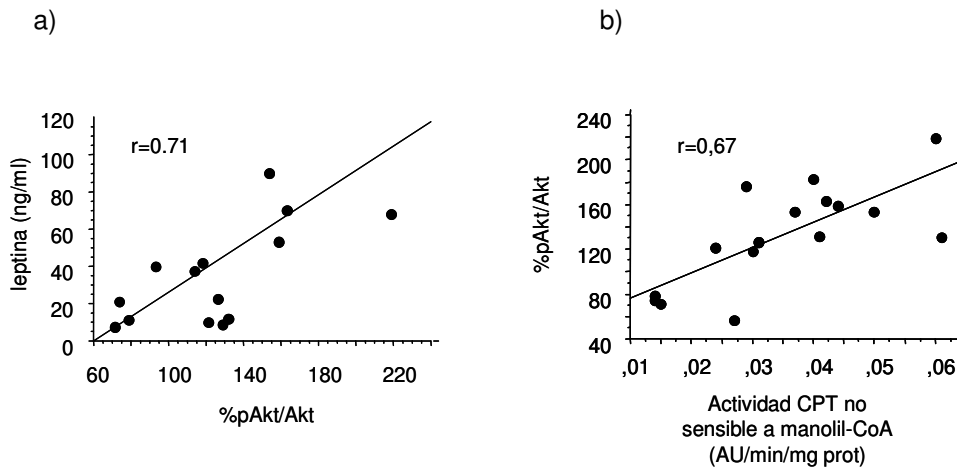


Figura 19. Correlación entre i) (a) la concentración de leptina plasmática y pAkt/Akt, y ii) (b) fosforilación de la Akt y la actividad de CPT no sensible a malonil-CoA (50 $\mu\text{mol/l}$), en corazón de animales tratados con solución salina o con 1 mg/kg de leptina (n= 7-12 animales/grupo).

Para corroborar dicha idea, el siguiente paso fue analizar la actividad de CPT en presencia de triciribina (TCB), un inhibidor de la fosforilación de la Akt. Para ello, los animales recibieron 1 mg/kg de TCB 30 min antes de recibir una dosis de leptina (1mg/kg ip) o suero fisiológico. Como se muestra en la figura 20, la capacidad del malonil-CoA (50 $\mu\text{mol/l}$) para inhibir la actividad de CPT se redujo un 65% en los animales que habían recibido leptina. El efecto de la leptina fue completamente bloqueado en presencia de TCB.

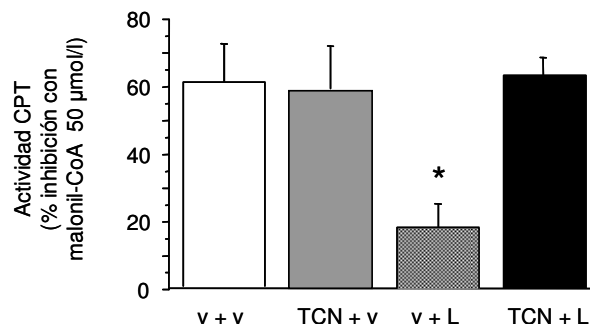


Figura 20. Determinación del porcentaje de inhibición de la actividad de CPT en presencia de malonil-CoA (50 $\mu\text{mol/l}$) en corazón de animales con hiperleptinemia exógena y TCB. En color blanco se representa el grupo control (v+v). En color gris, el grupo control con triciribina (TCB + v). En color negro rallado el grupo leptina control (v+L) y en negro, el grupo leptina con triciribina (TCB + L). Los valores se representan como la media \pm E.S.M (n=6-7-animales/grupo). * $p<0.05$; test de Newman Keuls.

2.- ANIMALES CON HIPERLEPTINEMIA ENDÓGENA

2.1.- Determinación de la actividad carnitin-palmitoiltransferasa (CPT) y su regulación por malonil-CoA en animales hiperleptinemicos por consumo prolongado de dieta HF

En segundo lugar quisimos evaluar la capacidad de inhibición de 50 $\mu\text{mol/L}$ de malonil-CoA sobre la actividad CPT en mitocondrias aisladas de animales alimentados con una dieta LF y HF. El análisis de los resultados (Figura 21) muestra un efecto significativo de la dieta y del malonil-CoA (2-ANOVA, $F_{(1,18)} = 15.417$; $p < 0.01$, para la dieta y $F_{(1,18)} = 18.448$; $p < 0.01$ para el malonil-CoA). El malonil-CoA inhibió la actividad CPT tanto en el grupo LF (1-ANOVA $F_{(1,8)} = 10.669$; $p < 0.01$) como en el HF (1-ANOVA $F_{(1,10)} = 6.757$; $p < 0.05$). Sin embargo, la inhibición detectada en el grupo LF fue significativamente más pronunciada que en el grupo HF (1-ANOVA $F_{(1,19)} = 14.104$; $**p < 0.01$). Además, la actividad total (en ausencia de malonil-CoA) fue también mayor en los animales HF (1-ANOVA $F_{(1,11)} = 4.982$; $\#p < 0.05$).

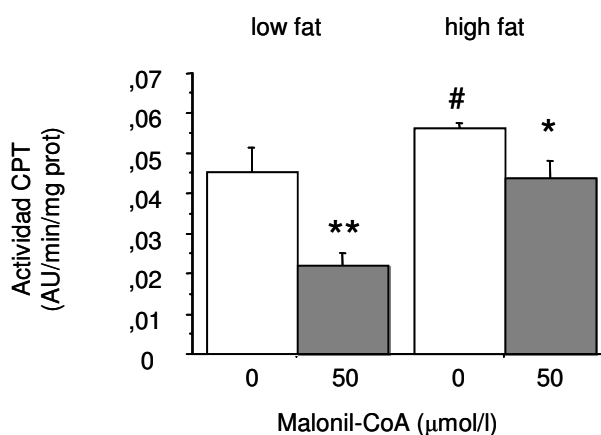


Figura 21. Determinación del porcentaje de inhibición de la actividad CPT en presencia de malonil-CoA (50 $\mu\text{mol/l}$) en corazón de animales con hiperleptinemia endógena. Las barras representan las medias \pm E.S.M. de la actividad CPT expresada en UA/min/mg de proteína, en ausencia (barra blanca) y presencia (barras grises) de malonil-CoA 50 $\mu\text{mol/L}$ ($n=5-7$), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ respecto de la actividad en ausencia de malonil-CoA; y # $p < 0.05$ respecto de la actividad CPT en ausencia de malonil-CoA del grupo control LF (test de *Newman Keuls*).

En el grupo LF, el malonil-CoA redujo la actividad CPT un 55% mientras que en el grupo HF la reducción fue de un 21%, lo que sugiere una pérdida de sensibilidad de CPT al efecto inhibitor del malonil-CoA. Este pequeño porcentaje de inhibición desapareció en el grupo HF tratado con leptina (1 mg/kg ip) (Figura 22). En este caso, el análisis estadístico revela que el efecto del malonil-CoA (2-ANOVA $F_{(1,18)} = 8.543$, $**p < 0.01$) fue significativo en el control (1-ANOVA $F_{(1,10)} = 6.757$, $*p < 0.05$) pero no en el grupo leptina (Figura 22). La concentración plasmática de leptina detectada en el grupo HF vehiculo y en el grupo HF leptina fueron de 28.4 ± 5.9 ng/ml y 82.5 ± 11.8 ng/ml ($p < 0.01$), respectivamente.

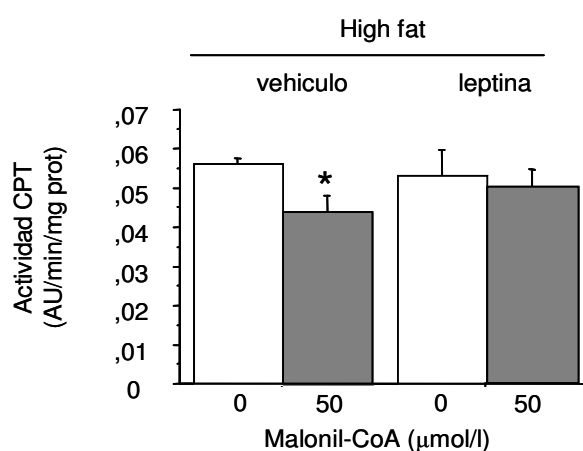


Figura 22. Determinación del porcentaje de inhibición de la actividad CPT en presencia de malonil-CoA (50 μmol/l) en corazón de animales HF tras la administración de leptina aguda. Las barras representan las medias ± E.S.M. de la actividad CPT expresada en UA/min/mg de proteína, en ausencia (barra blanca) y presencia (barras grises) de malonil-CoA 50 μmol/l (n=5-7), $**p < 0.01$ (test de *Newman Keuls*).

2.2.- Señalización de leptina

La dieta HF incrementó la fosforilación de la STAT-3 (ver figura 9 b, capítulo I) y de la Akt (1-ANOVA $F_{(1,18)} = 12.413$; $p < 0.01$, ver figura 23).

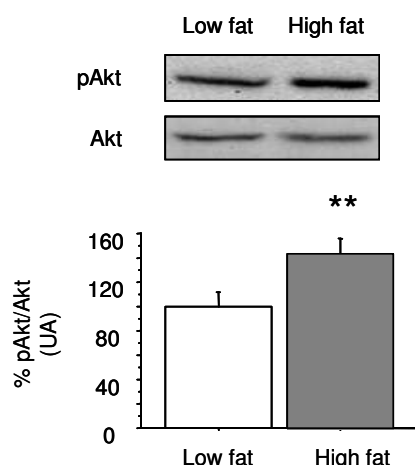


Figura 23. Determinación de la fosforilación de la Akt en el corazón de animales con hiperleptinemia endógena. La figura superior muestra un blot representativo de los experimentos realizados. La figura inferior muestra el análisis cuantitativo de las señales. En color blanco se representa el grupo control, LF. En color gris, el grupo HF. Los valores se representan como la media \pm E.S.M (n=8-9 animales/grupo) del porcentaje de inmunorreactividad con respecto al control. *** $p < 0.01$; test de Newman Keuls.

Este aumento en el grado de fosforilación de la Akt correlacionó positivamente con i) los niveles de leptina plasmática ($F_{(1,9)} = 7.705$; $p < 0.05$, $r = 0.65$, figura 24a), y ii) la actividad de CPT no sensible a malonil-CoA ($F_{(1,8)} = 8.571$; $p < 0.05$, $r = 0.75$, figura 24b).

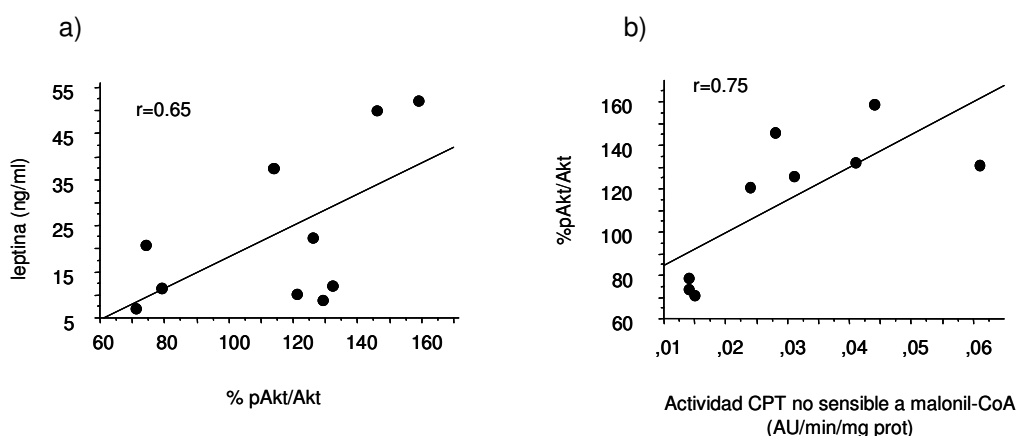


Figura 24. Correlación entre la concentración de leptina plasmática y pAkt/Akt (a), y correlación entre pAkt/Akt y la actividad CPT no sensible a malonil-CoA (50 $\mu\text{mol/l}$) (b) en corazón de animales con hiperleptinemia endógena. (n= 7-12 animales).

Esta mayor fosforilación de la Akt en los animales HF correlacionó negativamente ($F_{(1,18)} = 18.980$; $p < 0.001$; $r = 0.73$; figura 25b) con la menor fosforilación de la AMPK detectada en los mismos (1-ANOVA $F_{(1,17)} = 9.783$; $p < 0.01$; figura 25a).

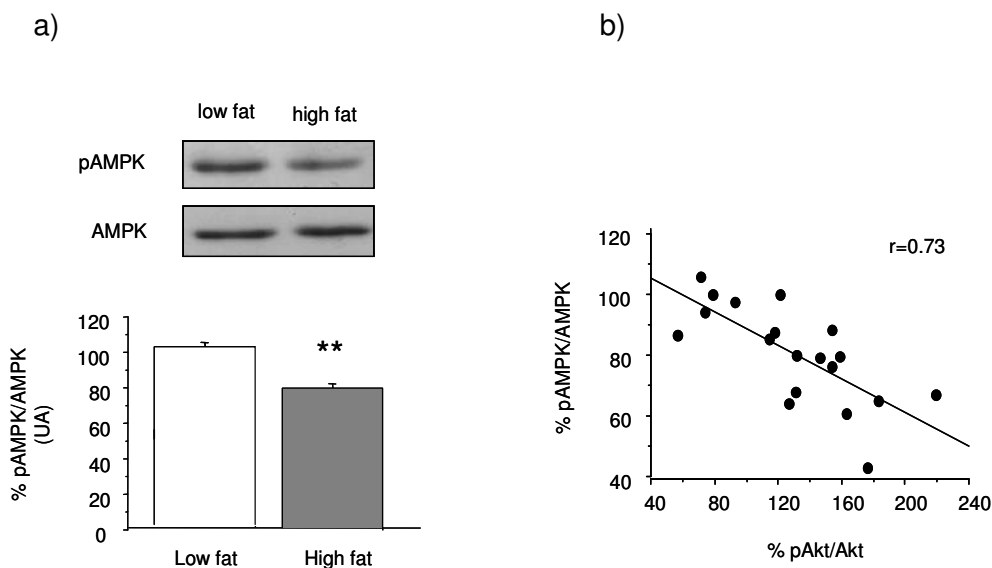


Figura 25. (a) Determinación de pAMPK/AMPK en el corazón de animales con hiperleptinemia endógena. La figura superior muestra un blot representativo de los experimentos realizados. La figura inferior muestra el análisis cuantitativo de las señales. En color blanco se representa el grupo control, LF. En color gris, el grupo HF. Los valores se representan como la media \pm E.S.M (n=8-9 animales/grupo) del porcentaje de inmunorreactividad con respecto al control. ** $p < 0.01$; test de *Newman Keuls*. (b) **Correlación entre pAMPK/AMPK y pAkt/Akt en corazón de animales con hiperleptinemia endógena.** (n= 8-9).

DISCUSIÓN

El principal objetivo de este trabajo ha sido demostrar la influencia de la leptina en el control de la actividad CPT y su regulación por malonil-CoA. Como se observa en la figura 15, en los animales control la actividad CPT se inhibe en presencia de 10 mM malonil-CoA mientras que en los animales tratados con leptina, dicha inhibición se observa en presencia de 100 mM malonil-CoA. La leptina aumenta la IC_{50} del malonil-CoA sobre la actividad CPT (IC_{50} control= $8.1 \pm 1.5 \mu\text{mol/l}$ vs leptina= $69.3 \pm 5.2 \mu\text{mol/l}$, $p < 0.01$). Esta acción de la leptina puede ser consecuencia de un efecto directo o indirecto de la hormona. La leptina, a nivel central, puede estimular el sistema nervioso simpático y, de forma indirecta, mediar efectos cardiacos. Sin embargo, el hecho de que la leptina también reduzca el efecto inhibitorio del malonil-CoA en explantes de corazón (Figura 17), sugiere una acción directa de la hormona sobre sus receptores cardiacos. El aumento de fosforilación de la STAT-3 y de la Akt tras la administración de leptina (Figuras 18a y 18b) demuestran la funcionalidad de los receptores cardiacos de leptina y sustenta la idea de una acción directa de la leptina sobre el corazón. Estos resultados sugieren además, la participación de la Akt y de la STAT-3 en el control de la actividad CPT y su sensibilidad a malonil-CoA. Nuestros datos corroboran la implicación de la Akt ya que hemos observado que: i) la administración de leptina aumenta la fosforilación de Akt en corazón (Figura 18b), ii) este aumento de pAkt correlacionó positivamente con la actividad CPT no sensible a malonil-CoA (Figura 19b) y iii) la administración de triciribina, un inhibidor de la activación de la Akt, antagoniza el efecto de la leptina sobre el malonil-CoA (Figura 20). Dichas observaciones no se han detectado con la pSTAT-3. Aunque con los datos obtenidos no es posible describir el mecanismo de acción exacto de la leptina, nuestros datos sugieren la implicación de la Akt, y no de la STAT-3, en la regulación de la actividad por leptina.

Se ha descrito que la CPT-I presenta sitios de fosforilación en residuos de serina y treonina localizados en la región C-terminal. La fosforilación de dicho residuos provoca un cambio de conformación en la CPT y reduce la sensibilidad de la enzima por malonil-CoA (Kerner et al., 2004). Igualmente se ha descrito que la CPT-I puede ser fosforilada por proteínas del citoesqueleto que son activadas por la acción de quinasas (Velasco et al., 1998). Nuestra hipótesis es que la activación de la Akt por leptina podría fosforilar la CPT en su residuo de Ser/Thr, reduciendo la afinidad de malonil-CoA por la enzima. Sin embargo serían necesarios nuevos estudios para esclarecer el mecanismo de acción exacto.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que una situación de hiperleptinemia exógena modula la inhibición de CPT-I por malonil-CoA. Sin embargo, los valores plasmáticos de leptina tras la administración aguda de la misma exceden las concentraciones fisiológicas. Por ello, se ha realizado el mismo estudio en animales en los que la hiperleptinemia se ha inducido mediante la administración de una dieta rica en grasa. En estas condiciones demostramos que la sensibilidad de CPT a malonil-CoA está disminuida en ratones HF hiperleptinémicos (Figura 21). Además, el efecto inhibitorio residual del malonil-CoA es aún sensible a la leptina exógena (Figura 22). Estos resultados muestran que los receptores cardiacos de leptina siguen siendo funcionales incluso tras períodos prolongados de ingesta HF y sugieren que la leptina puede prevenir la acumulación ectópica de lípidos regulando la CPT-I, incluso en tejidos con resistencia a insulina. El reciente trabajo realizado por Wright y cols. ha puesto de manifiesto que en animales alimentados con una dieta HF el incremento del metabolismo cardiaco de AG implica la activación de la Akt (Wright et al., 2009). También es interesante resaltar que ratones aleptinémicos y resistentes a insulina presentan esteatosis cardiaca que puede reducirse mediante el tratamiento con leptina (Lee et al., 2001). Todos estos datos sugieren un nexo de unión entre receptores cardiacos de leptina e insulina que puede constituir un importante mecanismo para la prevención de la esteatosis cardiaca en la obesidad.

Otro dato interesante de estudio es el descenso en la fosforilación de la AMPK detectado en el grupo HF, por su implicación en el control del metabolismo energético tanto en situaciones fisiológicas como fisiopatológicas (Dolinsky and Dyck, 2006; Arad et al., 2007). En estudios previos llevado a cabo por nuestro grupo demostramos que el consumo a corto plazo (8 semanas) de dieta HF activa la AMPK (Somoza et al., 2007) Por el contrario, en este estudio hemos observado que el consumo a largo plazo (32 semanas) de la dieta HF reduce la activación de la AMPK (Figura 25a). Esta disminución correlaciona negativamente con la pAkt detectada en los mismos animales (Figura 25b), como ya se ha demostrado en otros trabajos (Kovacic et al., 2003). Esto sugiere que en situaciones de exposición prolongada a dietas HF, es la pAkt y no la pAMPK la que parece modular el metabolismo cardiaco de los AG.

En resumen, este estudio demuestra que en condiciones fisiológicas, la leptina reduce la sensibilidad de CPT-I al efecto inhibitor del malonil-CoA tanto *in vivo* como *ex vivo*, y que en condiciones fisiopatológicas, como la hiperleptinemia inducida por obesidad, la leptina también es capaz de reducir la sensibilidad de CPT-I a malonil-CoA. Es posible considerar el papel de la leptina en la regulación de la CPT desde dos

perspectivas diferentes. Durante periodos de elevada ingesta calórica, cuando se produce un incremento de la adiposidad e hiperleptinemia y posteriormente obesidad y resistencia a insulina, la leptina puede modular el metabolismo de los AG favoreciendo la oxidación de los mismos y evitar su acumulación en tejidos no adiposos (Unger., 2003). Sin embargo el efecto de la leptina puede ser perjudicial en otros casos como la hipertrofia ventricular y/o la isquemia miocárdica. En estas condiciones un grado excesivo de β -oxidación inhibe la oxidación de piruvato (Randle et al.,1963) comprometiendo la disponibilidad de oxígeno y favoreciendo la acumulación de glucógeno y la aparición de cardiopatías como la arritmia (Dolinsky and Dyck, 2006, Luptak et al., 2007). En cualquier caso, este trabajo proporciona nuevas evidencias que ayudan a definir el remodelado del metabolismo cardiaco durante el desarrollo de obesidad inducida por dieta, necesario para comprender mejor las implicaciones clínicas de la obesidad y las alteraciones cardiacas (Lopaschuk et al., 2007; Carroll et al., 2005; Tschöp et al., 2007; Dyck et al., 2004; Huss and Kelly, 2005; Selvetella and Lembo, 2005).

CAPÍTULO IV

METABOLISMO CARDIACO: Alteraciones tardías en el modelo DIO

METABOLISMO CARDIACO: Alteraciones tardías en el modelo DIO

INTRODUCCIÓN

El sobrepeso y la obesidad se asocian a menudo con la aparición de dislipemias, hipertensión arterial y resistencia a insulina, y se consideran factores de riesgo independientes para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. La obesidad se asocia con un incremento del tejido adiposo y con alteraciones en la síntesis/secreción de adipocinas, relacionadas con la inflamación y la resistencia a insulina (Clement and Langin, 2007, Iacobellis and Sharma 2007), y que contribuyen a incrementar el riesgo de enfermedades cardiovasculares. Existen estudios que demuestran que estas alteraciones son las principales causas del remodelado cardiaco y de la aparición de disfunción cardiaca en individuos obesos (Lopaschuck et al., 2007; Iacobellis and Sharma, 2007b). Sin embargo, el hecho de que un individuo obeso no siempre presente resistencia a insulina o hipertensión, dificulta el estudio de las causas que relacionan la obesidad y la aparición de cardiomiopatías (Poornima et al., 2006; Iacobellis and Sharma, 2007; Arena and Lavie, 2010).

En los anteriores capítulos hemos demostrado que en el modelo DIO existe un incremento en la expresión y actividad de proteínas y enzimas implicadas en el metabolismo cardiaco de los AG que son claves para prevenir la esteatosis cardiaca (Somoza et al., 2007; Guzmán-Ruiz et al., 2010). El consumo de dietas ricas en grasas aumenta la capacidad oxidativa del corazón incrementando la actividad de enzimas como la citrato sintasa (Chess et al., 2009). Sin embargo, este aumento de actividad prolongado puede reducir la producción de ATP y aumentar el desacoplamiento mitocondrial (Lopaschuk et al., 2010), favoreciendo la formación de radicales libres y la aparición de disfunción mitocondrial (Liu et al., 2002; Chanseume et al., 2006; Boudina and Abel, 2007; Shen et al., 2006) que, a la larga, compromete el rendimiento y funcionamiento cardiaco (Randle et al., 1994; Korvald et al., 2000; Stanley et al., 2005). De hecho, en pacientes con isquemia cardiaca se puede recurrir a la administración de fármacos que reducen la oxidación de AG para tratar de restablecer un equilibrio entre la oxidación de AG e hidratos de carbono y prevenir la disfunción cardiaca en individuos obesos (Stanley and Chandler, 2002; Huss and Kelly, 2005, Lopaschuck et al., 2007, Lopaschuk et al., 2010).

En base a todas estas consideraciones, nuestra hipótesis es que los mecanismos compensatorios que tienen lugar en el metabolismo cardiaco, encaminados a incrementar la β -oxidación y prevenir la esteatosis cardiaca, podrían llegar a ser perjudiciales y reducir el rendimiento energético del corazón, además de desencadenar alteraciones en la morfología y función cardiaca, asociadas a la aparición de cardiomiopatías. El objetivo de este trabajo ha sido determinar si el consumo prolongado (32 semanas) de dieta HF deteriora el metabolismo cardiaco y si dicho deterioro afecta a la estructura y función cardiaca. Para ello se han utilizado ratones de 36 semanas de edad alimentados durante 32 semanas con una dieta LF o HF y se ha determinado en el corazón de los mismos: i) la actividad carnitinpalmítoil-transferasa (CPT) y la presencia/ausencia de TG, ii) la actividad lactato deshidrogenasa y el contenido de lactato, y la actividad piruvato deshidrogenasa (PDH) y la presencia/ausencia de glucógeno, iii) la actividad citrato sintasa, iv) la producción de ATP cardiaco y la expresión de proteínas desacoplantes, v) la producción del radical superóxido y la expresión de enzimas antioxidantes, vi) la estructura cardiaca y vii) la frecuencia cardiaca y la presión arterial, y el electrocardiograma.

RESULTADOS

1.- Determinación del peso corporal y bioquímica plasmática

Como ya se describió en el capítulo I, los animales del grupo HF presentaron un aumento significativo del peso corporal (Figura 1), que se acompañó de un incremento de los tejidos adiposos lumbar (** $p < 0.001$) y mesentérico (** $p < 0.001$). Igualmente, los niveles plasmáticos de leptina (* $p < 0.05$), insulina (** $p < 0.01$) y glucosa (* $p < 0.05$) fueron superiores en el grupo HF (Tabla 2). Por el contrario, los niveles plasmáticos de adiponectina (** $p < 0.001$) fueron inferiores en el grupo HF.

2.- Determinación del metabolismo energético

Como se resume en la tabla 6, los valores de lactato fueron similares en ambos grupos mientras que la actividad LDH fue inferior en el grupo HF (1-ANOVA, $F_{(1,21)} = 5.717$; * $p < 0.05$). También se detectó un descenso en la actividad PDH en el grupo HF (1-ANOVA, $F_{(1,9)} = 5.931$; * $p < 0.05$). Estos resultados sugieren un descenso en la contribución de lactato y piruvato al metabolismo energético cardíaco en el grupo HF. Por el contrario, el grupo HF presentó un aumento de actividad CPT total (1-ANOVA, $F_{(1,11)} = 4.982$; * $p < 0.05$) y de actividad CPT no sensible a malonil-CoA (1-ANOVA, $F_{(1,11)} = 8.567$; * $p < 0.05$) que sugiere una mayor captación mitocondrial de derivados acil-CoA. Además, se detectó un aumento en la actividad citrato sintasa (CS) en el grupo HF (1-ANOVA, $F_{(1,10)} = 5.349$; * $p < 0.05$) que sería indicativo de una mayor actividad mitocondrial y por tanto, de una mayor producción de ATP. Sin embargo, los niveles de ATP cardíacos fueron inferiores en el grupo HF (* $p < 0.05$, tabla 6) De hecho, el balance entre producción de ATP y actividad CS está reducido en el grupo HF (LF= 0.150 ± 0.02 nmol/U vs HF= 0.069 ± 0.01 nmol/U, $F_{(1,10)} = 12.32$, * $p < 0.05$), lo que evidencia un desacoplamiento entre la capacidad de la mitocondria para generar citrato y la síntesis de ATP.

| | Low fat | High fat |
|--|----------------|--------------------------|
| CPT total (UA/min/mg prot) | 0.042 ± 0.006 | 0.056 ± 0.002 * |
| CPT no sensible a malonil-CoA (UA/min/mg prot) | 0.025 ± 0.005 | 0.044 ± 0.004 * |
| Lactato (mmol/mg prot) | 0.629 ± 0.05 | 0.543 ± 0.04 |
| LDH (UI/mg prot) | 8568.1 ± 546.6 | 7063.9 ± 335.16 * |
| PDH (UA/min/mg prot) | 0.041 ± 0.001 | 0.035 ± 0.001 * |
| CS (UA/min/mg prot) | 0.037 ± 0.005 | 0.053 ± 0.005 * |
| ATP (nmol ATP/g prot) | 0.397 ± 0.05 | 0.252 ± 0.03 * |

Tabla 6. Metabolismo cardíaco tras 32 semanas de tratamiento dietético. Los datos representan la media ± ESM (n=6-8 animales/grupo) *p<0.05 (test de Newman Keuls).

3.- Determinación de la expresión de proteínas desacoplantes

De las tres isoformas más conocidas de la UCP (UCP-1, UCP-2 y UCP-3), sólo se detectó un aumento en la expresión de UCP-3 en corazón de animales HF (1-ANOVA, $F_{(1,12)} = 5.327$; *p<0.05) (Figura 26), lo que parece corroborar el desacoplamiento mitocondrial en el corazón de los animales HF.

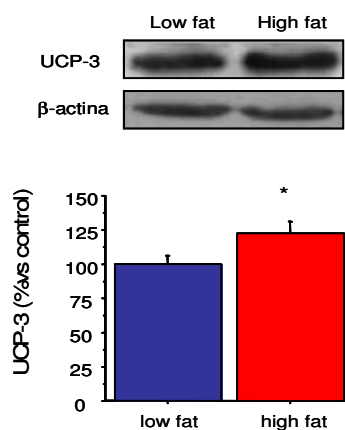


Figura 26. Expresión de la UCP-3 cardíaca tras 32 semanas de tratamiento dietético. La figura superior muestra un *blot* representativo de los experimentos realizados. La figura inferior muestra el análisis cuantitativo de las señales. En color azul se representa la dieta control LF y en color rojo, la dieta HF. Los valores se representan como la media ± E.S.M (n=6-8 animales/grupo) del porcentaje de inmunoreactividad con respecto al control. *p< 0.05 (test de Newman Keuls).

4.- Estrés oxidativo y sistemas antioxidantes

4.1.- Determinación de la concentración de anión superóxido

El aumento de actividad citrato sintasa junto con el mayor desacoplamiento mitocondrial detectado en los animales HF fomenta la producción de radicales libres en el cardiomiocito. Para determinar si realmente existe un aumento de radicales libres en el mismo, se cuantificó la producción de anión superóxido en corazón. Como muestra la figura 27, la producción de anión superóxido fue ligeramente superior en el grupo HF, aunque no llegó a ser significativamente diferente ($p=0.08$).

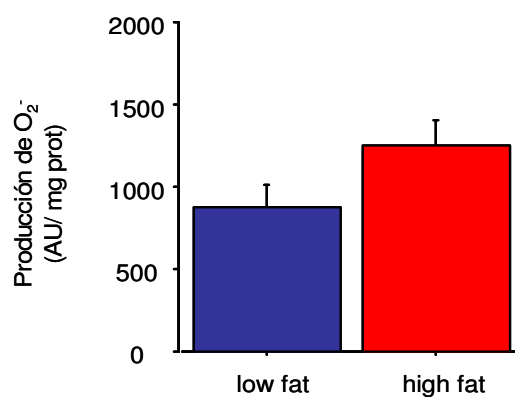


Figura 27. Producción de anión superóxido en corazón tras 32 semanas de tratamiento dietético. En color azul se representa la dieta control LF y en color rojo, la dieta HF. Los valores se representan como la media \pm E.S.M de la producción de anión superóxido medida en UA/mg prot ($n=6-8$ animales/grupo).

4.2.- Determinación de la expresión de enzimas antioxidantes superóxido dismutasas (Mn-SOD y Cu/zn-SOD) y catalasa

Los animales del grupo HF presentaron un aumento de expresión de la Mn-SOD (1-ANOVA, $F_{(1,11)}=5.017$; $*p<0.05$) (Figura 28a) y de la Cu/Zn-SOD (1-ANOVA, $F_{(1,11)}=5.593$; $*p<0.05$) (Figura 28b) después de 32 semanas de tratamiento dietético.

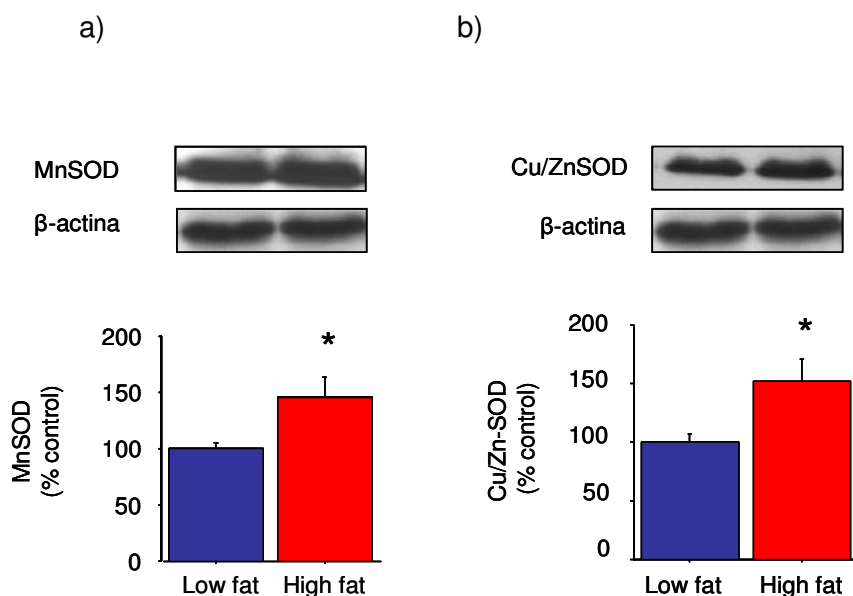


Figura 28. Efecto de la dieta sobre la expresión de la Mn-SOD (a) y la Cu/Zn-SOD (b) en corazón después de 32 semanas de dieta. La figura superior muestra un blot representativo de los experimentos realizados. La figura inferior muestra el análisis cuantitativo de las señales. En color azul se representa la dieta control, y en color rojo, la dieta HF. Los valores se representan como la media \pm E.S.M (n=6-8 animales/grupo) del porcentaje de inmunorreactividad con respecto al control, $*p< 0.05$ (test de *Newman Keuls*).

La expresión de la catalasa también aumentó significativamente en el corazón del grupo HF (1-ANOVA, $F_{(1,10)}=5.141$; $*p<0.05$) (Figura 29).

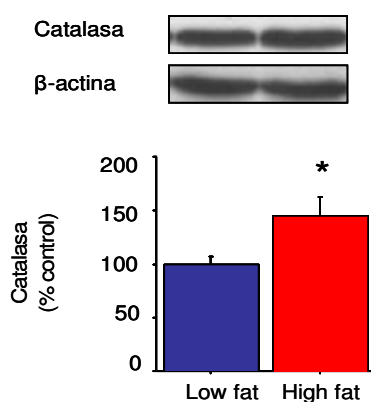


Figura 29. Efecto de la dieta sobre la expresión de la catalasa en corazón después de 32 semanas de tratamiento dietético. La figura superior muestra un *blot* representativo de los experimentos realizados. La figura inferior muestra el análisis cuantitativo de las señales. En color azul se representa la dieta control y en color rojo, la dieta HF. Los valores se representan como la media \pm E.S.M (n=6-8 animales/grupo) del porcentaje de inmunorreactividad con respecto al control, $*p < 0.05$ (test de *Newman Keuls*).

El aumento en la expresión de estas enzimas antioxidantes en el grupo HF podría justificar, en parte, la ausencia de diferencias significativas en la producción de anión superóxido en dichos animales HF.

4.3.- Determinación de la actividad glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH)

Como muestra la tabla 7, el grupo HF presentó un descenso en la actividad G6PDH (1-ANOVA, $F_{(1,9)}=5.597$; $*p<0.05$). Igualmente, la actividad total (1-ANOVA, $F_{(1,10)}=14.144$; $**p<0.01$) así como la actividad 6-fosfogluconato deshidrogenasa (1-ANOVA, $F_{(1,9)}=8.051$; $*p<0.05$) fueron también menores en el grupo HF.

| | Low fat | High fat |
|--|-------------------|--|
| Actividad total (Δ Abs/min/mg prot) | 0.016 \pm 0.001 | 0.010 \pm 0.001 ** |
| Actividad total (Δ Abs/min/mg prot) | 0.011 \pm 0.001 | 0.007 \pm 0.001 * |
| Actividad G6PDH (Δ Abs/min/mg prot) | 0.005 \pm 0.001 | 0.004 \pm 0.0002 * |

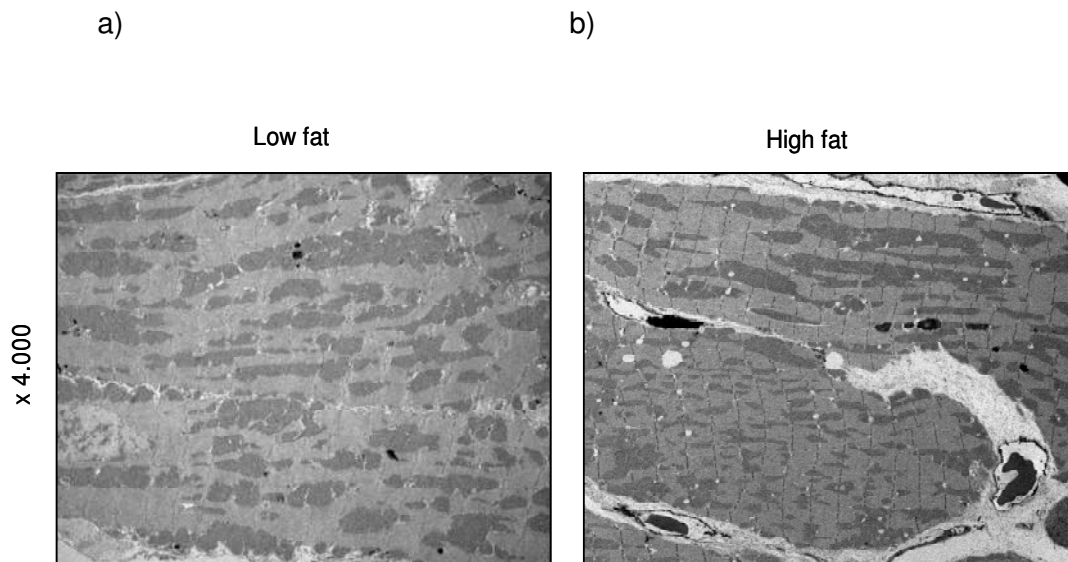
Tabla 7. Actividad G6PDH cardiaca. Los datos representan la media \pm ESM del incremento de absorbancia por minuto y por mg de proteína del tejido (n= 5-6 animales/grupo) $*p<0.05$ (test de *Newman Keuls*).

La G6PDH es un enzima clave para la obtención de NADPH, cofactor necesario para múltiples reacciones del organismo, como por ejemplo la regeneración del glutatión que intervienen en el control de la formación de radicales libres.

5.- Morfología cardíaca y daño mitocondrial

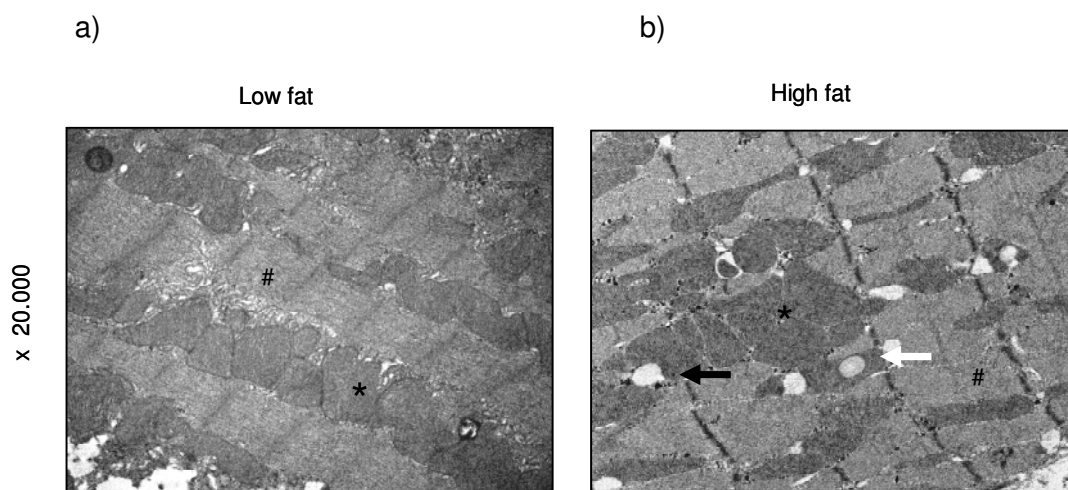
El peso del corazón aumentó aproximadamente un 7% en el grupo HF (** $p < 0.001$, tabla 1). Sin embargo, no se detectaron diferencias en el grosor de los cardiomiocitos (LF= $12.35 \pm 0.37 \mu\text{m}$ vs HF= $12.95 \pm 0.33 \mu\text{m}$). Tampoco se observaron diferencias en el contenido de TG cardíacos (Tabla 4).

El estudio de microscopía electrónica reveló alteraciones en la estructura del cardiomiocito. La microfotografía 1a, muestra el corazón en un animal control. Las fibras cardíacas (zona gris clara que se observa en la micrografía) presentan un estado normal, se encuentran compactadas unas con otras y rodeadas de tejido conectivo (zona blanca de la micrografía). Las mitocondrias (zonas gris oscura de la micrografía) presentan un aspecto y forma regular y se localizan alineadas a lo largo de las fibras cardíacas para favorecer la llegada de ATP a las mismas. Por el contrario, la microfotografía 1b muestra el corazón de un animal HF. En ella puede observarse que existe un aumento de tejido conectivo que dificulta el empaquetamiento de las fibras, y las mitocondrias presentan un aspecto más irregular, y ya no se encuentran tan alineadas a lo largo de las fibras sino que se localizan en pequeñas agrupaciones, lo que podría dificultar la llegada del ATP a las fibras cardíacas.



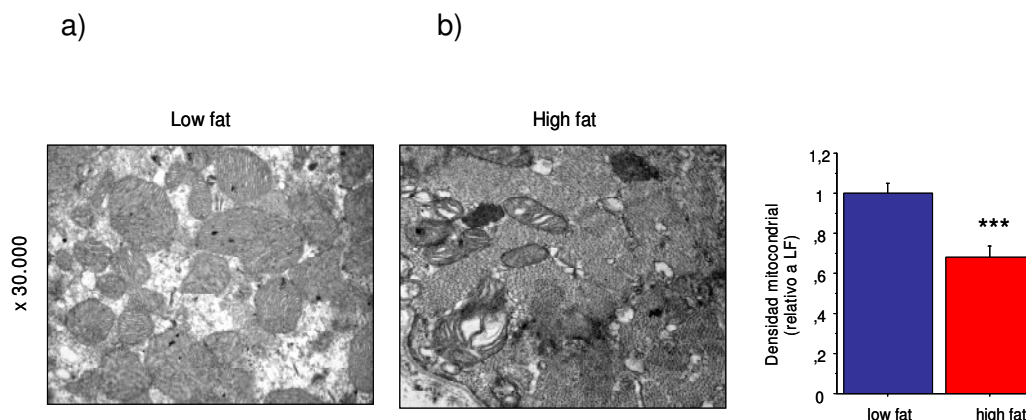
Microfotografía 1. Corte longitudinal de corazón tras 32 semanas de dieta LF (a) y HF (b). X4k

La microfotografía 2 muestra con más detalle las alteraciones en la forma y distribución de las mitocondrias. Como se observa en la microfotografía 2b, el grupo HF presenta unas mitocondrias más deformadas que en el grupo LF (Microfotografía 2a). Además se ve con más detalle como dichas mitocondrias se disponen en pequeñas agrupaciones perdiendo esa linealidad inicial. También se observan pequeñas infiltraciones de tejido conectivo entre las fibras (zonas en blanco de la micrografía).



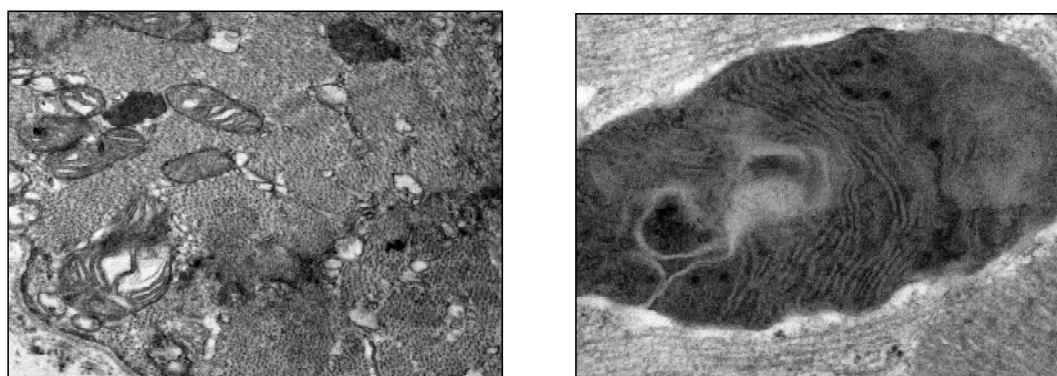
Microfotografía 2. Corte longitudinal de corazón tras 32 semanas de dieta LF (a) y HF (b). x4k. Fibra cardíaca (#), mitocondria (*), espacios vacíos (flecha negra), gota lipídica (flecha blanca).

También puede observarse en las microfotografías 3a y 3b, que el grupo HF presentó un descenso en su densidad mitocondrial con respecto al grupo LF (1-ANOVA $F_{(1,15)} = 19.676$; $***p < 0.001$).



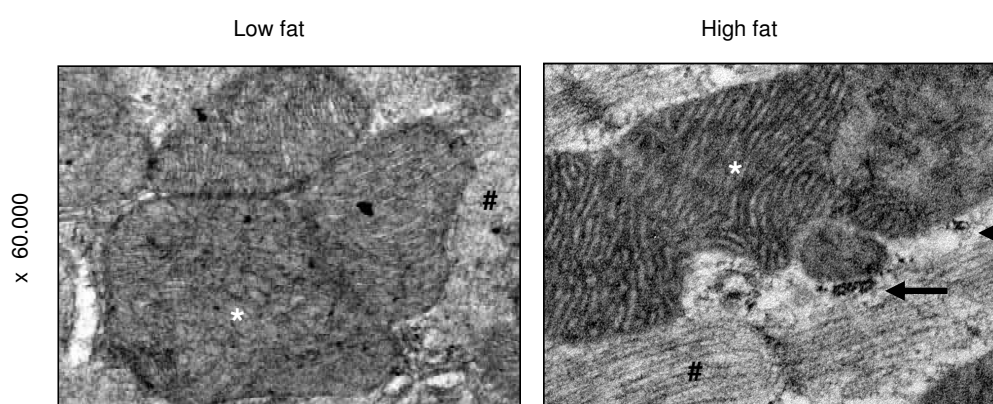
Micrografía 3. Corte transversal del corazón donde se observa la densidad mitocondrial en animales LF (a) y animales HF (b) de 32 semanas. x30k. La gráfica representa la cuantificación de dicha densidad mitocondrial. En color azul se representa la dieta LF y en color rojo, la dieta HF. Los valores se representan como la media \pm E.S.M del número de mitocondrias por área, tomando medidas de 20-30 áreas por ratón (n=6-7 animales/grupo).

Además de la menor densidad mitocondrial, las mitocondrias del grupo HF presentan importantes defectos en su estructura como revelan los amplios espacios que aparecen entre las crestas mitocondriales (Microfotografía 4) y las membranas aparecen más arrugadas y se van degradando hasta desaparecer dejando en su lugar espacios muertos que van rellenándose de tejido conectivo (Microfotografía 4).



Micrografía 4. Corte transversal del corazón donde se observa en detalle la degeneración mitocondrial en diferentes fases a) x40k. Detalle de una mitocondria en degradación b) x100k. Ambas microfotografías representan animales de 32 semanas de dieta HF.

Por último, las micrografías anteriores muestran también la presencia de acumulaciones en el corazón. Se ha detectado presencia de depósitos lipídicos en animales LF y HF. Sin embargo, como ya se mostró en el capítulo I (Tabla 4), no se detectaron diferencias significativas entre ellos. Igualmente, se ha detectado también la presencia de deposiciones de glucógeno. El glucógeno está presente en forma de gránulos que presentan un tamaño variable entre 10-40 nm. A diferencia de los lípidos, los gránulos de glucógeno solo se detectaron en los animales HF (Micrografía 5). Estos gránulos, localizados a lo largo de la fibra cardiaca, pueden llegar a ocasionar problemas en la conducción del impulso cardiaco y favorecer la aparición de arritmias.



Microfotografía 5. Ausencia o presencia de gránulos de glucógeno en corazón de animales LF (a) y HF (b) de 32 semanas. La flecha negra indica la acumulación de los gránulos de glucógeno (punteado negro), el * representa la mitocondria y #, la fibra cardiaca.

6.- Determinación de los parámetros hemodinámicos y el electrocardiograma

Para determinar si los animales presentaban hipertensión, se determinó su presión animal tras 32 semanas de dieta. Tanto la presión arterial sistólica (PAS) como la presión arterial diastólica (PAD) fueron similares entre grupos (PAS: LF= 85.7 ± 6.3 mmHg vs HF= 90.1 ± 5.5 mmHg, 1-ANOVA, $F_{(1,17)} = 0.227$; PAD: LF= 63.8 ± 5.1 mmHg vs HF= 60.6 ± 2.4 mmHg, 1-ANOVA, $F_{(1,17)} = 0.221$). Dichos resultados muestran que los ratones HF no presentan hipertensión asociada a la obesidad. Sin embargo, cuando se determinó la frecuencia cardiaca de los mismos, sí se observó una reducción significativa de la misma en los animales HF (LF= 85.7 ± 6.3 mmHg vs HF= 90.1 ± 5.5 mmHg, 1-ANOVA, $F_{(1,21)} = 8.038$; $p < 0.01$).

El análisis del electrocardiograma (ECG) mostró diferencias significativas en el segmento PR, siendo éste ligeramente más corto en el grupo HF (1-ANOVA, $F_{(1,6)}=6.502$, $*p<0.05$, tabla 8). Este acortamiento del segmento PR puede estar relacionado con la aparición de pre-excitación ventricular.

| | Low fat | High fat |
|----------------------|-------------|---------------------|
| Duración onda P (ms) | 13.5 ± 0.28 | 12.2 ± 0.7 |
| Intervalo PR (ms) | 46.5 ± 1.8 | 39.7 ± 1.9 * |
| Complejo QRS (ms) | 12.3 ± 0.88 | 11.9 ± 0.3 |
| Intervalo QT (ms) | 24.5 ± 1.1 | 23.5 ± 0.8 |
| Onda T (ms) | 8.8 ± 0.7 | 8.9 ± 1.3 |

Tabla 8. Análisis de las ondas que componen el electrocardiograma. Los datos representan la media ± ESM (n=4-6 animales/grupo) $*p<0.05$ (test de Newman Keuls).

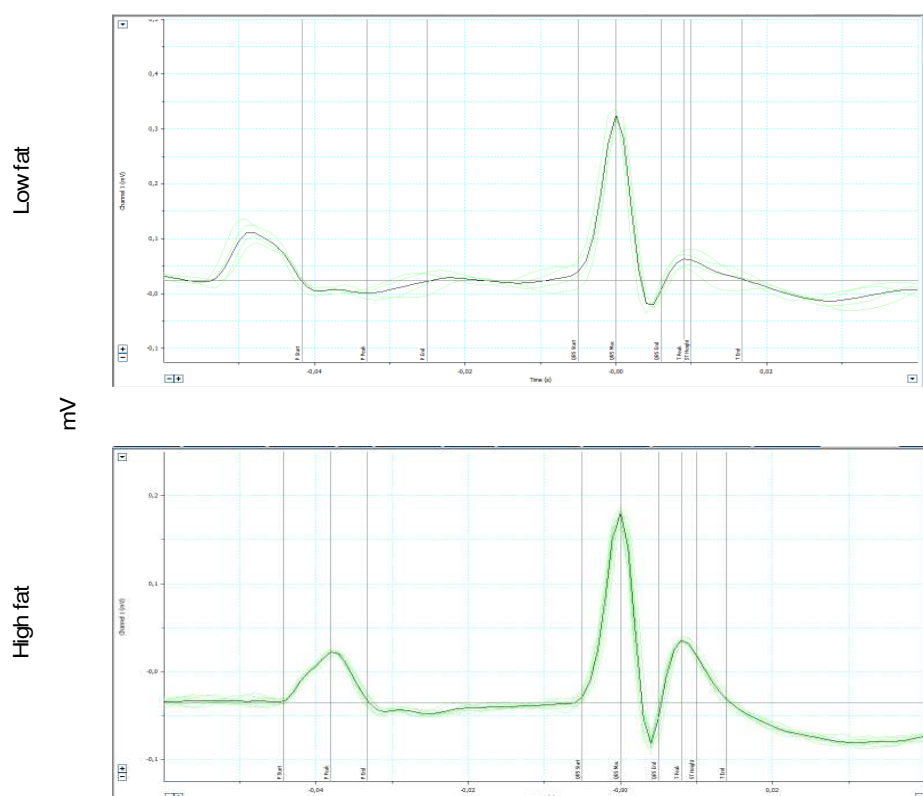


Figura 30. Representación gráfica del electrocardiograma de un animal LF y un animal HF tras 32 semanas de tratamiento dietético. mV, milivoltios, ms, milisegundos.

DISCUSIÓN

Este estudio demuestra que el consumo a largo plazo (32 semanas) de una dieta HF activa sistemas enzimáticos que favorecen la β -oxidación en detrimento de la oxidación de piruvato. Esta situación coincide con la ausencia de estosis cardiaca en los animales HF. Sin embargo se ha observado la acumulación de glucógeno en el corazón de los mismos. El corazón no presenta hipertrofia aunque su estructura está afectada. Se ha detectado un descenso en la densidad mitocondrial así como cambios en la disposición y estructura de las mismas. También se ha detectado un descenso en la producción de ATP, que junto con la menor densidad mitocondrial podrían indicar alteraciones en la función cardiaca. De hecho, el electrocardiograma revela un acortamiento del intervalo PR, compatible con pre-excitación ventricular, que junto con los depósitos de glucógeno detectados parecen revelar problemas en la conducción cardiaca (Arad et al., 2002; Arad et al., 2003).

Como ya se describió en el capítulo anterior, el consumo a largo plazo de dieta HF supone un descenso de fosforilación de AMPK (pAMPK), un aumento de la actividad carnitin-palmitoiltransferasa (CPT) y una desensibilización de la CPT a la inhibición por malonil-CoA (Guzmán-Ruiz et al., 2010). Igualmente, se ha demostrado que la leptina está implicada en la regulación de la actividad CPT y que es independiente de la acción de la AMPK y del malonil-CoA (Guzmán-Ruiz et al., 2010). Además, también se ha detectado un aumento de la actividad citrato sintasa (CS) en los animales HF. Sin embargo, estos animales presentan una menor producción de ATP (Tabla 6), siendo el balance ATP/CS menor en el grupo HF (LF= 0.150 ± 0.02 nmol/U vs HF= 0.069 ± 0.01 nmol/U, $F_{(1,10)} = 12.32$, * $p < 0.05$). La mayor actividad CS puede suponer un aumento en la concentración de citrato mitocondrial, que fomenta la salida del mismo al citosol. El citrato citoplasmático puede servir de sustrato para síntesis de malonil-CoA e inhibir la β -oxidación, o bien puede inhibir la glucólisis (Randle, 1998). Ambos procesos contribuirían a la reducción del contenido de ATP cardiaco.

Otra causa que se relaciona con un descenso en la producción de ATP es el desacoplamiento mitocondrial y el aumento de expresión de las proteínas desacoplantes (UCP). De las isoformas más conocidas (UCP-1, UCP-2 y UCP-3) sólo se detectó un aumento en la expresión de UCP-3 en el grupo HF (Figura 26). Esta es la primera vez que se ha demostrado la sobreexpresión cardiaca de UCP-3 tras la administración de una dieta HF a largo plazo. También es interesante resaltar que la UCP-3 parece contribuir a disipar la formación de especies reactivas de oxígeno

(ROS) tanto *in vivo* (Burger et al., 2008) como *in vitro* (Barreiro et al., 2009). Por el contrario, la UCP-2 que también se sobreexpresa en este tipo de dietas (Surwit et al., 1998) y en modelos DIO a corto plazo (Somoza et al., 2007), permanece sin cambios a más largo plazo. Estos resultados sugieren que el desacoplamiento mitocondrial puede pasar de ser una adaptación favorable tras el consumo de dieta HF a corto plazo, a ser una condición deletérea tras el consumo de dieta HF a largo plazo. Aunque nuestros datos no evidencian los mecanismos implicados en esta sobreexpresión de UCP-3, es posible que la hiperleptinemia detectada en los mismos pueda estar implicada, como ya se vio inicialmente con UCP-2 (Somoza et al., 2007). De hecho, el miocardio presenta sensibilidad a la acción de la leptina después de un consumo a largo plazo de una dieta rica en grasas (Guzmán-Ruiz et al., 2010), y además se ha visto que la leptina induce la expresión de UCP-3 en otros tejidos como el músculo esquelético y el páncreas (Gong et al., 1997; Cusin et al., 1998).

Aunque el aumento de β -oxidación y el desacoplamiento mitocondrial pueden contribuir al aumento de ROS (Liu et al., 2002; Adam-Vizi, 2005), los animales HF no presentaron un aumento de anión superóxido (Figura 27). No obstante, hemos detectado un aumento en la expresión de las enzimas antioxidantes (Figuras 28a, 28b y 29) que sugieren un mecanismo compensatorio al posible incremento de ROS. Sin embargo, estos mecanismos parecen ser incapaces de proteger la integridad de las mitocondrias ya que se han detectado irregularidades en su estructura y organización así como una disminución en la densidad de las mismas (ver micrografías). Todas estas alteraciones, a menudo se asocian con la aparición de estrés oxidativo (Bonnard et al., 2008).

En este estudio también se ha detectado un descenso en la actividad piruvato deshidrogenasa (PDH) en los animales HF (Tabla 6). La PDH regula la entrada de piruvato al interior de la mitocondria. El descenso de la actividad PDH indica una menor oxidación de piruvato y podría también justificar, en parte, la menor formación de ATP. Esta menor oxidación de piruvato coincide con la aparición de gránulos de glucógeno en el corazón de los animales HF (Micrografia 5). Este resultado nos hizo plantearnos las causas que pueden conllevar la aparición de glucógeno en el corazón de los animales HF. La glucosa después de transformarse en glucosa-6-fosfato (G6P) puede seguir diferentes rutas que incluyen: i) la glucólisis, ii) la ruta de las pentosas fosfato y iii) la glucogénesis. En nuestro estudio hemos explorado todas estas posibilidades y hemos detectado un descenso en la concentración de lactato y en la actividad LDH (Tabla 6), que junto con la menor actividad PDH detectada en los

animales HF, sugieren un descenso de la capacidad glucolítica del corazón. Además, la elevada actividad citrato sintasa detectada en los animales HF sugiere un aumento de producción del citrato, que puede actuar como inhibidor alostérico de la fosfofructoquinasa-1, enzima clave en el reclutamiento de G6P para la vía glucolítica (ciclo de Randle) (Randle et al., 1963; Randle et al., 1998). Por otro lado, la ruta de las pentosas fosfato parece estar reducida en los animales HF ya que las actividades enzimáticas implicadas en la misma están reducidas (Tabla 7). Estos resultados parecen evidenciar a la síntesis de glucógeno como la única vía posible para la glucosa. Aunque, serían necesarios nuevos estudios para evaluar la actividad de la glucógeno sintasa para corroborarlo.

Los resultados del estudio electrocardiográfico revelan un acortamiento del intervalo PR, que sugiere la existencia de pre-excitación ventricular. Esta alteración cardiaca se ha relacionado con la presencia de glucógeno (Arad et al., 2002, Arad et al., 2007). Nuestros resultados, aunque son preliminares, sugieren que el consumo a largo plazo de dieta HF podría conducir a la aparición de arritmias con pre-excitación ventricular. Este resultado es muy interesante ya que se muestra por primera vez que un tratamiento dietético puede conllevar la aparición de este tipo de cardiopatía. La pre-excitación ventricular también se ha asociado con un defecto en la expresión de AMPK. En nuestro modelo hemos detectado la presencia de acumulaciones de glucógeno junto con una disminución de la pAMPK (la forma activa de la AMPK), pero no se ha observado hipertrofia cardiaca. Es interesante resaltar que las vías accesorias están presentes en humanos en el momento del nacimiento pero que desaparecen al poco tiempo de vida (James et al., 1994). Sin embargo, se ha propuesto que dichas vías pueden de nuevo reaparecer en corazones que presentan una actividad AMPK anormal (Sidhu et al., 2005). En nuestro caso, es posible que el descenso de pAMPK detectado en los animales HF pueda inducir la reaparición de dichas vías accesorias o bien, que el tratamiento dietético administrado desde los estadios iniciales (los animales recibieron la dieta una semana después del destete) afecta negativamente la degeneración natural de las conexiones atrio-ventriculares.

En resumen nuestros datos muestran que las adaptaciones que tienen lugar en el metabolismo cardiaco sometido a un consumo crónico de dieta rica en grasas evitan la acumulación ectópica de lípidos, pero terminan afectando a la estructura y a la conducción cardiaca, así como a la acumulación de glucógeno, que podría favorecer la aparición de arritmias.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos tras la realización de este trabajo han permitido elaborar las siguientes conclusiones:

1.- El consumo prolongado de dietas ricas en grasas saturadas (HF) causa resistencia a leptina en el hígado y en el tejido adiposo, pero no en el corazón. Además, este tipo de dietas provocan esteatosis hepática pero no hemos detectado depósitos ectópicos de lípidos en el miocardio.

2.- En **estadios iniciales** del desarrollo de DIO, el corazón adapta su metabolismo energético aumentando: i) la expresión de UCP-2 y ii) la fosforilación de la AMPK (pAMPK), que correlacionan positivamente con los niveles plasmáticos de leptina. Estos cambios son compatibles con un aumento de la β -oxidación y podrían contribuir a prevenir la esteatosis cardiaca.

3.- En estadios **más avanzados** de DIO el corazón adapta su metabolismo: i) aumentando la actividad del complejo carnitina-palmitoiltransferasa (CPT) y ii) reduciendo su sensibilidad al malonil-CoA, por un mecanismo en el que podría estar implicada la leptina. Estos cambios también pueden contribuir a aumentar el catabolismo de los ácidos grasos

4.- El aumento de la expresión de enzimas antioxidantes (Mn-SOD, Zn-SOD y catalasa) junto con la disminución de la síntesis de ATP y las alteraciones de la estructura y densidad mitocondriales sugieren un aumento del estrés oxidativo.

5.-La aparición de depósitos de glucógeno, unido a la menor actividad de la ruta de las pentosas fosfato y de la actividad piruvato deshidrogenasa indican que parte de la glucosa captada por el miocardio podría desviarse hacia la síntesis de glucógeno.

6.-La presencia de depósitos de glucógeno en corazón es compatible con el acortamiento del intervalo PR y podrían ser causa de alteraciones en la conducción cardiaca y en la aparición de arritmias.

BIBLIOGRAFÍA

ADAM-VIZI V "Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources" *Antioxid Redox Signal*, 2005; 7:1140-1149

AHIMA RS, PRABAKARAN D, MANTZORO C, QU D, LOWELL B, MARATOS FLIER "Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting" *Nature* 1996; 382: 250-252.

ANDERSON U, FILIPSSON K, ABBOTT CR, WOODS A, SMITH K, BLOOM SR, CARLING D, SMALL CJ "AMP-activated Protein Kinase Plays a role in the control of food intake" *J Biol Chem*, 2004; 279(13): 12005-12008

ARAD M, BENSON DW, PEREZ-ATAYDE AR, MCKENNA WJ, SPARK EA, KANTER RJ, MCGARRY K, SEIDMAN JG, SEIDMAN CE "Constitutively active AMP kinase mutation causes glycogen stores disease mimicking hypertrophy cardiomyopathy" *J Clin Invest* 2002; 109: 357-362

ARAD M, MOSKOWITZ IP, PATEL VV, AHMAD F, PEREZ-ATAYDE AR, SAWYER DB, WALTER M, LI GH, BURGON PG, MAGUIRE CT, STAPLETON D, SCHMITT JP, GUO XX, PIZARD A, KUPERSHMIDT S, RODEN DM, BERUL CI, SEIDMAN CE, SEIDMAN JG "Transgenic mice overexpressing mutant PRKAG2 define the cause of Wolf-Parkinson-White syndrome in glycogen storage cardiomyopathy" *Circulation* 2003; 107: 2850-2856

ARAD M, SEIDMAN CE, SEIDMAN JG "AMP-activated protein kinase in the heart. Role during health and disease" *Cir Res* 2007; 100: 474-488

ARANCETA-BARTRINA J, SERRA-MAJEN L, FOZ-SALA M, MORENO-ESTEBAN B, GRUPO COLABORATIVO SEEDO "Prevalencia de obesidad en España" *Med Clin (Barc)*, 2005; 125(12): 460-466

ARENA R, LAVIE CJ "The obesity paradox and outcome in heart failure: is excess bodyweight truly protective?" *Future Cardiol*. 2010; 6:1-6

ARHÉN B, MÄNSSON S, GINGERICH RL, HAVEL PJ "Regulation of plasma leptin in mice: influence of age, high-fat diet, and fasting" *Am J Physiol*, 1997; 273: R113-R120

ARTHAM SM, VENTURA HO. "Insuficiencia cardiaca y la "paradoja de la obesidad": la historia continúa" *Rev Esp Cardiol*, 2007; 60(11): 1113-1117

ATKINSON LL, FISCHER MA, LOPASCHUK GD. "Leptin activates cardiac fatty acid oxidation independent of changes in the AMP-activated protein kinase-acetyl-CoA carboxylase-malonyl-CoA axis" *J Biol Chem*, 2002; 277(33): 29424-29430

BACHMANN E, WEBER E "Effects of corn oil addition to the diet on the energy metabolism of heart, liver and kidney of female rats" *Pharmacol Toxicol*. 1990; 67(1):49-55.

BARAZZONI R, NAIR KS "Changes in uncoupling protein 2 and 3 expressions in aging rat skeletal muscle, liver and heart" *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 280: E413-E419

BARNEA M, SHAMAY A, STARK AH, MADAR Z “A high-fat diet has a tissue-specific effect on adiponectin and related enzyme expression” *Obesity* 2006; 14(2): 2145-2153

BAROUCH LA, BERKOWITZ DE, HARRISON RW, O'DONELL CP, HARE JM. “Disruption of leptin signalling contributes to cardiac hypertrophy independently of body weight in mice” *Circulation* 2003; 108: 754-759

BARREIRO E, GARCIA-MARTÍNEZ C, MAS S, AMETLLER E, GEA J, ARGILÉS JM, BUSQUETS S, LÓPEZ-SORIANO FJ “UCP3 overexpression neutralizes oxidative stress rather than nitrosative stress in mouse myotubes” *FEBS Letters* 2009; 583:350–356

BEFROY DE, PETERSEN KF, DUFOUR S, MASON GF, DE GRAAF RA, ROTHMAN DL, SHULMAN GI. “Impaired mitochondrial substrate oxidation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic patients” *Diabetes* 2007; 56(5):1376-1381

BJÖRBAEK C, UOTANI S, DA SILVA B, FLIER JS “Divergent signalling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor” *J. Biol. Chem.* 1997; 272, 32686-32695

BJÖRBAEK C, ELMQUIST JK, MICHL P, AHIMA RS, BUEREN A, McCALL AL, FLIER JS “Expression leptin receptor isoforms in rat brain microvessels” *Endocrinology* 1998; 139: 3485-3491

BJÖRBAEK C, BUCHHOLLZVRM, DAVIS SM BATES SH, PIERROZ DD, GU H, NEEL BG, MYERS MG Jr, FLIER JS “ Divergent roles of SH2 in ERK activation by leptin receptors” *J Biol Chem*, 2001; 276(7): 4747-4755

BJÖRBAEK C, KAHN BB “Leptin signalling in the central nervous system and the periphery” *Rec Proc Horm Res*, 2004; 59: 305-331

BONNARD C, DURAND A, PEYROL S, CHANSEAUME E, CHAUVIN MA, MORIO B, VIDAL H, RIEUSSET J. “Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice” *J Clin Invest* 2008; 118(2):789-800

BOSENGE E, SOMMER O, SCHWEMMER M, BÜNGER R “Antioxidant pyruvate inhibits cardiac formation of reactive oxygen species through changes in redox state” *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279: H2431-H2438

BOSS O, HAGEN T, LOWELL B “Uncoupling protein 2 and 3. Potential regulators of mitochondrial energy metabolism” *Diabetes* 2000; 49: 143-156

BOUDINA S, ABEL D. “Diabetic cardiomyopathy revisited” *Circulation* 2007; 115: 3213-3223

BROWN GC “The leaks and slips of bioenergetic membranes” *FASEB J* 1992; 6: 2961-2965

BROWN AM, MAYFIELD DK, VOLAUFOVA J, ARGYLOPOULUS G “The gene structure and minimal promoter of the human agouti related protein” *Gene* 2001; 277: 231-238

BRYSON JM, PHUYAL JL, SWAN V, CATERSON ID “Leptin has acute effects on glucose and lipid metabolism in both lean and gold thioglucose-obese mice” *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 1999; 277 (40): E417– E422

BULLEN JW Jr, BLUHER S, KELESIDIS T, MANTZOROS CS “Regulation of adiponectin and its receptors in response to development of diet-induced obesity” *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 292: E1079-E1086

CARO JF, KOLACZYNSKI JW, NYCE MR, OHANNESIAN JP, OPENTANOVA I, GOLDMAN WH, LYNN RB, ZHANG PL, SINHA MK, CONSIDINE RV. “Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance” *Lancet.* 1996; 348(9021):159-161

CARROLL R, CARLEY AN, DYCK JRB, SEVERSON DL “Metabolic effects of insulin on cardiomyocytes from control and diabetic *db/db* mouse hearts” *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2005; 288: E900–E906

CATALUCCI D, LATRONICO M, ELLINGSEN O, CONDORELLI G “Physiological myocardial hypertrophy: how and why?” *Frontiers in Bioscience*, 2008; 13: 312-324

CERNKOVICH ER, DENG J, BOND MC, COMBS TP, HARP JB “Adipose specific disruption of signal transducer and activator of transcription 3 increases body weight and adiposity” *Endocrinology* 2008; 149 (4): 1588-1590

CHA SH, HU Z, CHOHNAN S, LANE MD “Inhibition of hypothalamic fatty acid synthase triggers rapid activation of fatty acid oxidation in skeletal muscle” *PNAS*, 2005; 102(41): 14557-14562

CHAN JL, BLUHER S, YIANNAKOURIS N, SUCHARD MA, KRATZSCH J, MANTZOROS CS. “Regulation of circulating soluble leptin receptor levels by gender, adiposity, sex steroids, and leptin :observational and international studies in humans.” *Diabetes* 2002; 51: 2105-2112

CHANSEAUME E, MALPUECH-BRUGÈRE C, PATRAC V, BIELICKI G, ROUSSET P, COUTURIER K, SALLES J, RENOUP JP, BOIRIE Y, MORIO B. “Diets high in sugar, fat, and energy induce muscle type-specific adaptations in mitochondrial functions in rats” *J Nutr* 2006; 136(8):2194-2200

CHEN G, KAZUNORI KOYAMA K, YUAN X, LEE Y, ZHOU YT, O'DOHERTY R, NEWGARD CB, UNGER RH “Disappearance of body fat in normal rats induced by adenovirus-mediated leptin gene therapy” *PNAS* 1996; 93: 14795-14799

CHESS DJ, KHAIRALLAH RJ, O'SHEA KM, XU W, STANLEY WC “A high-fat diet increases adiposity but maintains mitochondrial oxidative enzymes without affecting development of heart failure with pressure overload” *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009; 297(5):H1585-H1593

CHOI CS, KIM YB, LEE FN, ZABOLOTNY JM, KAHN BB, YOUN JH “Lactate induces insulin resistance in skeletal muscle by suppressing glycolysis and impair insulin signaling” *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 283: E233-E240

CHRISTOFFERSEN C, BOLLANO E, LINDEGAARD ML, BARTELS ED, GOETZE JP, ANDERSEN CB, NIELSEN LB "Cardiac lipid accumulation associated with diastolic dysfunction in obese mice" *Endocrinology*, 2003; 144(8):3483-90

CHUA Jr SC, CHUNG WK, WU-PENG XS, ZHANG Y, LIU SM, TARTAGLIA L, LEIBEL RL "Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the Ob (leptin) receptor" *Science* 1996; 271: 994-996

COLEMAN DL "Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndrome in mice" *Diabetologia* 1978; 14: 141-148

COMMINS SP, WATSON PM, PADGETT MA, DUDLEY A, ARGYROPOULOS G, GETTYS TW "Induction of uncoupling protein expression in brown and white adipose tissue by leptin" *Endocrinology*, 1999; 140(1):292-300

COYLE CH, MARINEZ LJ, COLEMAN MC, SPITZ DR, WEINTRAUB NL, KADER KN "Mechanisms of H₂O₂-induced oxidative stress in endothelial cells" *Free Radical Biol and Med* 2006; 40: 2206-2213

CLEMENT K, LANGIN D. "Regulation of inflammation-related genes in human adipose tissue" *J Intern Med.* 2007; 262:422-430

CRESCENZO R, BIANCO F, FALCONE I, PRISCO M, LIVERINI G, IOSSA S. "Alterations in hepatic mitochondrial compartment in a model of obesity and insulin resistance" *Obesity (Silver Spring)* 2008; 16(5):958-964

CUSIN I, ZAKRZEWSKA KE, BOSS O, MUZZIN P, GIACOBINO JP, RICQUIER B, JEANRENAUD B, ROHNER-JEANRENAUD F "Chronic central leptin infusion enhances insulin-stimulated glucose metabolism and favors the expression of uncoupling proteins" *Diabetes*, 1998; 47: 1014-1019

DELEO FR, QUINN MT "Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: molecular interaction of oxidase proteins" *J Leukocyte Biol* 1996; 60:677-91

DISTLER AM, KERNER J, HOPPEL CL "Mass spectrometric demonstration of the presence of liver carnitine palmitoyltransferase-I (CPT-I) in heart mitochondria of adult rats" *Biochim Biophys Acta* 2009; 1794(3):431-7

DIXON RA, DAVIDSON SM, WYNNE AM, YELLON DM, SMITH CC "The cardioprotective action of leptin are lost in the zucker obese (fa/fa) rats" *J Cardiovasc Pharmacol*, 2009; 53(4): 311-317

DOLINSKY VW, DYCK JBR "Role of AMP-activated protein kinase in healthy and diseased hearts" *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291: H2557-2569

DONG F, LI Q, SREEJAYAN N, NUNN JM, REN J. "Metallothionein prevents high-fat diet induced cardiac contractile dysfunction: role of peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1alpha and mitochondrial biogenesis" *Diabetes* 2007; 56(9):2201-2212

DUBE JJ, BHATT BA, DEDOUSIS N, BONEN A, O'DOHERTY RM. "Leptin, skeletal muscle lipids, and lipid-induced insulin resistance" *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; 293: R642–R650

DYCK JR, CHENG JF, STANLEY WC, BARR R, CHANDLER MP, BROWN S, WALLACE D, ARRHENIUS T, HARMON C, YANG G, NADZAN AM, LOPASCHUK GD "Malonyl coenzyme a decarboxylase inhibition protects the ischemic heart by inhibiting fatty acid oxidation and stimulating glucose oxidation" *Circ Res* 2004; 94(9):e78-84

DYCK JRB, LOPASCHUK GD "AMPK alteration in cardiac physiology and pathology: enemy or ally?" *J Physiol* 2006; 574.1: 95-112

Eaton S, Fukumoto K, Paladio Duran N, Pierro A, Spitz L, Quant PA, Bartlett K "Carnitine palmitoyl transferase I and the control of myocardial beta-oxidation flux" *Biochem Soc Trans* 2001; 29(Pt 2):245-50

EATON S "Control of mitochondrial β -oxidation flux" *Progress in Lipid Research*, 2002; 41:197-239

EL-HASCHIMI K, PIERROZ DD, HILEMAN SM, BJØRBÆK C, FLIER JS "Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity" *J. Clin. Invest.* 2000; 105:1827–1832

ELMQUIST JK, AHIMA RS, MARATOS-FLIER, FLIER JS, SAPER CB "Leptin activates neurons in ventromedial hypothalamus and brainstem" *Endocrinology* 1996; 138: 839-842

ESTUDIO PROPECTIVO DELPHI. Libro blanco. Costes economicos y sociales de la obesidad y sus patologias asociadas (hipertensión, hiperlipidemias y diabetes) 1999: 51-66

FABBRINI E, MAGKOSA F, MOHAMMEDA S, PIETKAA T, ABUMRADA NA, PATTERSONA BW, OKUNADEA A, KLEINA S "Intrahepatic fat, not visceral fat, is linked with metabolic complications of obesity" *PNAS*, 2009; 106(36): 15430-15435

FAIN JN, MADAN AK, HILER ML, CHEEMA P, BAHOUTH SW "Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans" *Endocrinology* 2004; 145(5):2273-2282

FEDIUC S, PIMENTA AS, GAIDHU MP, CEDDIA RB "Activation of AMP-activated protein kinase, inhibition of pyruvate dehydrogenase activity, and redistribution of substrate partitioning mediate the acute insulin-sensitizing effects of troglitazone in skeletal muscle cells" *J cell Physiol* 2008; 215: 392-400

FEUVRAY D, DARMELLAH A "Diabetes-related metabolic perturbations in cardiac myocyte" *Diabetes Metab* 2008; 34(1): S3-S9

FISHMAN S, MUZUMDAR RH, ATZMON G, MA X, YANG X, EINSTEIN FH, BARZILAI N. "Resistance to leptin action is the major determinant of hepatic triglyceride accumulation *in vivo*" *FASEB J.* 2007; 21, 53–60.

FLEGAL KM, CARROL MD, KUCZMARSKI RJ, JOHNSON CL "Overweight and obesity in the United States: prevalence and trends, 1960-1994" *Int J obes Relat Metab Disord* 1998; 22: 39-47

FLEURY C, NEVEROVA M, COLLINS S, RAIMBAULT S, CHAMPIGNY O, LEVI-MEYRUEIS C, SELDIN F, SURWIT RS, RICQUIER D AND WARDEN CH. "Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hiperinsulinemia". *Nat Genet* 1997; 15: 269-272

FOLMES CD, LOPASCHUK GD "Role of malonyl-CoA in heart disease and the hypothalamic control of obesity" *Cardiovasc Res* 2007; 73(2):278-87

FRAYN KN "Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux" *Diabetologia*, 2002; 45(9): 1201-1210

FRIEDMAN JM, HAALAS JH "Leptin and the regulation of body weight in mammals" *Nature* 1998; 395(6704):763-70

FRÜHBECK G "Intracellular signalling pathways activated by leptin" *Biochem J* 2006; 393:7-20

GAO Q, WOLFGANG MJ, NESCHEN S, MORINO K, HORVATH TL, SHULMAN GI, FU XY. "Disruption of neural signal transducer and activator of transcription 3 causes obesity, diabetes, infertility, and thermal dysregulation" *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004; 101(13):4661-4666

GARLID KD, JABUREK M, JEZEK P "The mechanism of proton transport mediated by mitochondrial uncoupling" *FEBS Lett* 1998; 438: 10-14

GONG DL, HE Y, KARAS M, REITMAN M "Uncoupling protein-3 is a mediator of thermogenesis regulated by thyroid hormone, β 3-adrenergic agonists, and leptin" *J Biol Chem* 1997; 272: 24129-24132.

GOTO T, ONUMA T, TAKEBE K, KRAL JG "The influence of fatty liver on insulin clearance and insulin resistance in non-diabetic Japanese subjects" *Int J Obes Relat Metab Disord* 1995; 19(12):841-845

GUPTA SA, LEVINE RJ, GUPTA RS, YOUNG ME, LIONETTI V, LABINSKY V, FLOYD BC, OJAIMI C, BELLOMO M, WOLIN MS, RECCHIA FA "Glucose-6-phosphate dehydrogenase-derived NADPH fuels superoxide production in the failing heart" *J Mol Cell Cardiol* 2006; 41: 340-349

GUO R, MA H, GAO F, ZHONG L, REN J "Metallothionein alleviates oxidative stress-induced endoplasmic reticulum stress and myocardial dysfunction" *J Mol Cell Cardiol* 2009 47(2):228-37

GUZMÁN-RUIZ R, SOMOZA B, GIL-ORTEGA M, MERINO B, CANO V, ATTANÉ C, CASTAN-LAURELL I, VALET P, FERNÁNDEZ-ALFONSO MS, RUIZ-GAYO M "Sensitivity of cardiac carnitine palmitoyltransferase to malonyl-CoA is regulated by leptin. Similarities with a model of endogenous hyperleptinemia" *Endocrinology* 2010; 151(3): 1010-1018

HAUSMAN DM, DIRIGOMATO M, BARTNESS TJ, HAUSMAN GT, MARTIN RJ "The biology of white adipocyte proliferation" *Obesity reviews*, 2001; 2: 239-254

HARDIE DG "Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status" *Endocrinology* 2003; 144(12): 5179-5183

HARDIE DG "The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream" *J Cell Sci* 2004; 117(Pt 23):5479-87

HERVEY GR "The effect of lesion in the hypothalamus in parabiotic rats" *J Physiol* 1939; 130: 313-314

HILFIKER-KLEINER D, HILFIKER A, FUCHS M, KAMINSKI K, SCHAEFER A, SCHIEFFER B, HILLMER A, SCHMIEDL A, DING Z, PODEWSKI E, POLI V, SCHNEIDER MD, SCHULZ R, PARK JK, WOLLERT KC, DREXLER H "Signal transducer and activator of transcription 3 is required for myocardial capillary growth, control of interstitial matrix deposition, and heart protection from ischemic injury" *Cir Res*, 2004; 95(2): 187-195

HIROSUMI J, TUNCMAN G, CAHNG L, GORGUN CZ, UYSAL KT, MAEDA K, KARIN M, HOTAMISLIGIL GS "A central role of JNK in obesity and insulin resistance" *Nature* 2002; 420: 333-336

HOERTER J, GONZALZ-BARROSO MM, COUPLAN E, MATEO P, GELLY C, CASSARD-DOULCIER AM, DIOLEZ P, BOUILLAUD F "Mitochondrial uncoupling protein 1 expressed in the heart of transgenic mice protects against ischemic-reperfusion damage" *Circulation* 2004; 110: 528-533

HOGGARD N, MERCER JG, RAYNER DV, MOAR K, TRAYHURN P, WILLIAMS LM "Localization of leptin receptor mRNA splice variant in murine peripheral tissues by RT-PCR and in situ hybridation" *Biochem Biophys Res Commun*, 1997; 232(2): 383-387

HOTAMISLIGIL GS "The role of TNF-alpha and TNF receptors in obesity and insulin resistance" *J Intern Med* 1999; 245: 621-625

HORWICH TB, FONAROW GC, HAMILTON MA, MACLELLAN WR, WOO MA, TILLISCH JH. "The relationship between obesity and mortality in patients with heart failure" *J Am Coll Cardiol*. 2001; 38(3):789-95

HU Z, CHA SH, CHOHNAN S, LANE MD "Hypothalamic malonyl-CoA as a mediator of feeding behaviour" *PNAS* 2003; 100(2): 12624-12629

HUSS JM AND KELLY DP "Mitochondrial energy metabolism in heart failure: a question of balance" *J Clin Invest*, 2005; 115:547-555

IACOBELLIS G, SHARMA AM "Epicardial adipose tissue as new cardio-metabolic risk marker and potential therapeutic target in the metabolic syndrome" *Curr Pharm Des* 2007; 13:2180-2184

JAIN M, BRENNER DA, CUI L, LIM CC, WANG B, PIMENTEL DR, KOH S, SAWYER DB, LEOPOLD JA, HANDY DE, LOSCALZO J, APSTIEN CS, LIAO R "Glucose-6-phosphate dehydrogenase modulates cytosolic redox status and contractile phenotype in adult cardiomyocytes" *Cir Res*, 2003; 93: e9-e16

JAIN M, CUI L, BRENNER DA, WANG B, HANDY DE, LEOPOLD JA, LOSCALZO J, APSTIEN CS, LIAO R "Increased myocardial dysfunction alter ischemia-reperfusion in mice lacking glucosa-6-phosphate dehydrogenase" *Circulation* 2004; 109: 898-903

JAMES TN. "Normal and abnormal consequences of apoptosis in the human heart: from postnatal morphogenesis to paroxysmal arrhythmias" *Circulation* 1994; 90:556-573

JANOSVSKÁ A, HATZINIKOLAS G, STAIKOPOULOS V, McINERNEY J, MANO M, WITTERT GA "AMPK and ACC phosphorylation: effect of leptin, muscle fibre type and obesity" *Mol Cell Endocrinol* 2008; 284: 1-10

JENSEN J, LAI C "Regulation of muscle glycogen synthase phosphorilation and kinetic propriertis by insulin, exercise, adrenaline and role in insulin resistance" *Arch Physiol Biochem* 2009; 115(1): 13-21

JIN YC, KIM KJ, KIM YM, HA YM, KIM HJ, YUN UJ, BAE KH, KIM YS, KANG SS, SEO HG, LEE JH, CHANG KC "Anti-apoptotic effect of magnolol in myocardial ischemia and reperfusion injury requires extracellular signal-regulated kinase1/2 pathways in rat in vivo" *Exp Biol Med* 2008; 233(10):1280-1288

JOHANNSEN DL, RAVUSSIN E "The role of mitochondria in health and disease" *Curr Opin Pharmacol.* 2009 9(6):780-786

KADOWAKI T, YAMAUCHI T "Adiponectin and adiponectin receptors" *Endocrine Reviews* 2005; 26(3): 439-451

KARMAZYN M, PURDHAM DM, RAJAPUROHITAM V, ZEIDAN A "Leptin as a cardiac hypertrophic factor: a potential target for therapeutics" *Trends Cardiovasc Med* 2007; 17:206–211

KENNEDY GC "The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat" *Proc Roy Soc* 1953; 336-352

KERBEY AL, RANDLE PJ, COOPER RH, WHITEHOUSE S, PASK HT, DENTON RM "Regulation of pyruvate dehydrogenase in rat heart. Mechanism of regulation of proportions of dephosphorylated and phosphorylated enzyme by oxidation of fatty acids and ketone bodies and of effects of diabetes: role of coenzyme A, acetyl-coenzyme A and reduced and oxidized nicotinamide-adenine dinucleotide" *Biochem J* 1976; 154(2):327-48

KERNER J, DISTLER AM, MINKLER P, PARLAND W, PETERMAN SM, HOPPEL CL "Phosphorylation of rat liver mitochondrial carnitine palmitoyltransferase-I" *J Biol Chem* 2004; 279:41104-41113

KIM F, PHAM M, MALONEY E, RIZZO NO, MORTON GJ, WISSE BE, KIRK EA, CHAIT A, SCHWARTZ MW "Vascular Inflammation, Insulin Resistance, and Reduced Nitric Oxide Production Precede the Onset of Peripheral Insulin Resistance" *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28:1982-1988

KLINGENBERG M, HUANG SC "Structure and function of uncoupling protein from brown adipose tissue" *Biochim Biophys Acta* 1999; 1415: 271-296

KOVACIC S, SOLTYS CLM, BARR AJ, SHIOJIMA I, WALSCH K, DYCK JRB "Akt activity negatively regulates phosphorylation of AMP-activated protein kinase in the heart" *J Biol Chem* 2003; 278:39422-39427

KORVALD C, ELVENES OP, MYRMEL T. "Myocardial substrate metabolism influences left ventricular energetics in vivo" *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 278:H1345-H1351

KUDO N, BARR AJ, BARR RL, DESAI S, LOPASCHUK GD "High rates of fatty acid oxidation during reperfusion of ischemic hearts are associated with a decrease in malonyl-CoA levels due to an increase in 5'-AMP-activated protein kinase inhibition of Acetyl-CoA Carboxylase" *J Biol Chem* 1995; 270(29): 17513-17520

LAFONTAN M "Fat cell: afferent and efferent messages define new approaches to treat obesity" *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 2005; 45: 119-146

LAMMERT A, KIESS W, BOTTNER A, GLASOW A, KRATZSCH J. "Soluble leptin receptor represents the main leptin binding activity in human blood." *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 283: 982-988

LANGIN D, FRÜHBECK G, FRAYN KN, LAFONTAN M "Adipose tissue: development, anatomy and function" p99-108. En *Obesity.Science to practice*. WILLIAMS G, FRÜHBECK G. Ed Wiley-Blackwell. Chichester, 2009

LEE Y, WANG MY, KAKUMA T, WANG ZW, BABCOCK E, McCORKLE K, HIGA M, ZHOU YT, UNGER RH "Liporegulation in diet-induced obesity. The antiesteatotic role of hyperleptinemia" *J Biol Chem* 2001; 276(8): 5629-5635

LEE YR, NASEEM H, DUPLOMB L, PARK BH, GARRY DJ, RICHARDSON JA, SCHAFFER JE, UNGER RH "Hyperleptinemia prevents lipotoxic cardiomyopathy in acyl CoA synthase transgenic mice" *PNAS* 2004; 101 (37): 13624–13629

LEE WJ, KOH EH, WON C, KIM MS, PARK JY, LEE KU "Obesity: the role of AMP-activated protein kinase in body weight regulation" *Int J Biol* 2005; 37: 2254-2259

LI J, HU X, SELVAKUMAR P, RUSSELL RR, CUSHMAN SW, HOLMAN GD, YOUNG LH "Role of the nitric oxide pathway in AMPK-mediated glucose uptake and GLUT4 translocation in heart muscle" *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 287: E834-E841

LI XM, MA YT, YANG YN, ZHANG JF, CHEN BD, LIU F, HUANG Y, HAN W, GAO XM. "Ischemic postconditioning protects hypertrophic myocardium by ERK1/2 signaling pathway: experiment with mice" *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2009 Mar 31; 89(12):846-50

LIN J, BARB CR, MATTERI RL, KRAELING RR, CHEN X, MEINERSMANN RJ, RAMPACK GS "Long form leptin receptor mRNA expression in the brain, pituitary and other tissues in the pig" *Domest Anim Endocrinol* 2000; 19(1): 53-61

LISTENBERGER LL, HAN X, LEWIS SE, CASES S, FARESE RV, ORY DS, SCHAFFER JE “Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity” *PNAS*, 2003; 100 (6): 3077–3082

LIU Y, FISKUM G AND SCHUBERT D “Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain” *J Neurochem* 2002; 80:780-787

LÖLLMANN B, GRÜNINGER S, STRICKER-KRONGRAD A, CHIESI M “Detection and quantification of the leptin receptor splice variants Ob-Ra, b and e in different mouse tissues” *Biochem Biophys Res Commun*, 1997; 238: 648-652

LOPASCHUCK GD, FOLMES C, STANLEY W “Cardiac energy metabolism in obesity” *Circ Res* 2007; 101: 335-347

LOPASCHUK GD, USSHER JR, FOLMES CDL, JASWAL JS AND STANLEY WC “Myocardial fatty acid metabolism in health and disease.” *Physiol Rev* 2010; 90:207-258

LOWELL BB, S-SUSULIC V, HAMANN A, LAWITTS JA, HIMMS-HAGEN J, BOYER BB, KOZAK LP, FLIER JS “Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue” *Nature* 1993; 366: 740-742

LU J, ZANG WJ, YU XJ, CHEN LN, ZHANG CH, JIA B “Effects of ischemia-mimetic factors on isolated rat ventricular myocytes” *Exp Physiol* 2005; 90:4 497-505

LUPTAK I, SHEN M, HE H, HIRSHMAN MF, MUSI N, GOODYEAR LJ, YAN J, WAKIMOTO H, MORITA H, ARAD M, SEIDMAN CE, SEIDMAN JG, INGWALL JS, BALSCHI JA, TIAN R “Aberrant activation of AMP-activated protein kinase remodels metabolic network in favor of cardiac glycogen storage” *J Clin Invest* 2007; 117:1432-1439

MALLET RT “Pyruvate: metabolic protector of cardiac performance” *Proc Soc Exp Biol Med* 2000; 223 (2): 136-14

MÄRIN P, ANDERSON B, OTTOSSON M, OLBE L, CHOWDHURY B, KVIST H, HOLM G, SJÖSTRÖM L, BJÖRNTORP P “ The morphology and metabolism of intraabdominal adipose tissue in men” *Metabolism*, 1992; 41: 1242-1248

MARSIN AS, BERTRAND L, RIDER MH, DEPREZ J, BEAULOYE C, VINCENT MF, VAN DEN BERGHE G, CARLING D, HUE L “Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia” *Curr Biol* 2000;10(20):1247-55

MARTIN E, ROSENTHAL RE, FISKUM G “Pyruvate dehydrogenase complex: metabolic link to ischemic brain injury and target of oxidative stress” *J Neurosci Res* 2005; 79(1-2): 240-247

McGARRY JD “Dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes” *Diabetes* 2002; 51: 7-18

McGAVOCK JM, VICTOR RG, UNGER RH, SZCZEPANIAK LS "Adiposity of the Heart, Revisited" *Ann Intern Med.* 2006; 144:517-524

McGAVOCK JM, LINGVAY I, ZIB I, TILLERY T, SALAS N, UNGER R, LEVINE BD, RASKIN P, VICTOR RG, SZCZEPANIAK LS "Cardiac steatosis in diabetes mellitus. A 1H-Magnetic Resonance Spectroscopy Study" *Circulation.* 2007; 116:1170-1175

McLEOD C, AZIZ A, HOYT RF, McCOI JP, SACK MN "Uncoupling protein 2 and 3 function in concert to augment tolerance to cardiac ischemia" *J Biol Chem* 2005; 280(39): 33470-33476

MILLET L, VIDAL H, ANDREELLI F "Increased uncoupling protein-2 and 3 mRNA expressions during fasting in obese and lean humans". *J Clin Invest* 1997; 100: 2665-70

MINHAS KM, KHAN SA, RAJU SV, PHAN AC, GONZALEZ DR, SKAF MW, LEE K, TEJANI AD, SALIARIS AP, BAROUCH LA, O'DONNELL CP, EMALA CW, BERKOWITZ DE, HARE JM "Leptin repletion restores depressed {beta}-adrenergic contractility in ob/ob mice independently of cardiac hypertrophy" *J Physiol* 2005; 565(Pt 2):463-474

MINOKOSHI Y, KIM Y-B, PERONI OD, FRYER LEE GD, MÜLLER C, CARLING D, KHAN BB "Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase" *Nat* 2002; 415: 339-343

MINOKOSHI Y, ALQUIER T, FURUKAWA N, KIM YB, LEE A, XUE B, MU J, FOOUFELLE F, FERRE P, BIRNBAUM MJ, STUCK BT, KAHN BB "AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signaling in the hypothalamus" *Nature* 2004; 428: 569-574

MITCHELL P "Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation" *Biol Rev* 1966; 41: 445-502

MITCHELL JW, THOMAS JA "Phosphorylation of bovine heart glycogen synthase by two protein kinases" *J Biol Chem* 1981; 12: 6160-6169

MOHAZZAB-H KM, KAMINSKI PM, WOLIN MS "Lactate and PO₂ modulates superoxide anion production in bovine cardiac myocytes: potential role of NADH oxidase" *Circulation* 1997; 96(2): 614-620

MORISCO C, CONDORELLI G, TRIMARCO V, BELLIS A, MARRONE C, CONDORELLI G, SADOSHIMA J, TRIMARCO B "Akt mediates the cross-talk between β -adrenergic and insulin receptors in neonatal cardio myocytes" *Cir Res* 2005; 96: 180-188

MUNZBERG H, FLIER JS, BJØRBÆK C "Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice" *Endocrinology* 145(11):4880-4889

MURAKAMI M, NARAZAKI M, HIBI M, YAWATA H, YASUWAKA K, HAMAGUCHI M, TAGA T, KISHIMOTO T. "Critical cytoplasmic region of the interleukin 6 signal transducer gp130 is conserved in the cytokine receptor family." *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 11349-53, 1991

NABBEN M, HOEKS J, BRIEDÉ JJ, GLATZ JF, MOONEN-KORNIPS E, HESSELINK MK, SCHRAUWEN P “The effect of UCP3 overexpression on mitochondrial ROS production in skeletal muscle of young versus aged mice” *FEBS Lett.* 2008;582(30):4147-52

NEGORO S, KUNISADA K, FUJIO Y, FUNAMOTO M, DARVILLE MI, EIZIRIK DL, OSUGI T, IZUMI M, OSHIMA Y, NAKAOKA Y, HIROTA H, KISHIMOTO T, YAMAUCHI-TAKINAHARA K. “Activation of signal transducer and activator of transcription 3 protects cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress through the upregulation of manganese superoxide dismutase” *Circulation* 2001; 104: 979-981

NEGRE-SALVAYRE A, HIRTZ C, CARRERA G, CAZENAVE R, TROLY M, SALVAYRE R, PENICAUD L, CASTEILLA L “A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation” *FASEB J* 1997; 11:809-815

NICHOLLS DG “Brown adipose tissue mitochondria” *Biochim Biophys Acta* 1979; 549: 1-29

NISHIKAWA S, YASOSHIMA A, DOI K, NAKAYAMA H, UETSUKA K. “Involvement of sex, strain and age factors in high fat diet-induced obesity in C57BL/6J and BALB/cA mice” *Exp Anim* 2007; 56(4): 263-272

OFIR M, ARAD M, PORAT E, FREIMARK D, CHEPURKO Y, VIDNE BA, SEIDMAN CE, SEIDMAN JG, KEMP BE, HOCHHAUSER E “Increased glycogen storage due to gamma-AMPK overexpression protects against ischemia and reperfusion damage” *Biochem Pharmacol* 2008; 75(7): 1482-1491

OKERE IC, CHANDLER MP, MCELFRISH TA, RENNISON JH, SHAROV V, SABBAAH HN, TSENG KY, HOIT BD, ERNSBERGER P, YOUNG ME, STANLEY WC. “Differential effects of saturated and unsaturated fatty acid diets on cardiomyocyte apoptosis, adipose distribution, and serum leptin” *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006; 291(1):H38-44

OUWENS DM, DIAMANT M, FODOR M, HABETS DDJ, PELSERS MMAL, EL-HASNAOUI M, DANG ZC, VAN DEN BROM CE, VLASBLOM R, RIETDIJK A, BOER C, COORT SLM, GLATZ JFC, LUIKEN JJFP “Cardiac contractile dysfunction in insulin-resistant rats fed a high-fat diet is associated with elevated CD36-mediated fatty acid uptake and esterification” *Diabetologia* 2007; 50:1938–1948

PAIDOS' 84. Estudio epidemiológico sobre nutrición y obesidad infantil. Madrid: Jomagar; 1985

PAOLISSO G, TAGLIAMONTE MR, GALDERISI M, ZITO GA, PETROCELLI A, CARELLA C, DE DIVITIIS O, VARRICCHIO M “Plasma leptin level is associated with myocardial wall thickness in hypertensive insulin-resistant men” *Hypertension* 1999; 34(5):1047-52.

PARK SY, CHO YR, KIM HJ, HIGASHIMORI T, DANTON C, LEE MK, DEY A, ROTHERMEL B, KIM YB, KALINOWSKI A, RUSSELL KS, KIM JK. “Unravelling the temporal pattern of diet-induced insulin resistance in individual organs and cardiac dysfunction in C57BL/6 mice” *Diabetes* 2005; 54(12):3530-40

PARK BH, WANG MY, LEE Y, YU X, RAVAZZOLA M, ORCI L, UNGER RH "Combined leptin actions on adipose tissue and hypothalamus are required to deplete adipocyte fat in lean rats: implications for obesity treatment" *J Biol Chem*, 2006; 281(52):40283-91

PI-SUYER FX "The obesity epidemic: pathophysiology and consequences of obesity" *Obesity Research* 2002; 10(2): 97S-104S

POWER GW, NEWSHOLME EA "Dietary fatty acids influence the activity and metabolic control of mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I in rat heart and skeletal muscle" *J Nutr* 1997; 127: 2142-2150

POORNIMA IG, PARIKH P, SHANNON RP "Diabetic cardiomyopathy: the search for a unifying hypothesis" *Circulation Research* 2006; 98(5):596-605.

PURDHAM DM, ZOU MX, RAJAPUROHITAM V, KARMAZYN M "Rat heart is a site of leptin production and action" *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004; 287(6): H2877-2884

RANDLE PJ, GARLAND PB, HALES CN, NEWSHOLME EA "The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus" *Lancet* 1963; 13:785-789

RANDLE PJ "Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years" *Diabetes Metab Rev* 1998; 14:263-268

RAJAPUROHITAM V, GAN XT, KIRSHENBAUM LA, KARMAZYN M. "The obesity-associated peptide leptin induces hypertrophy in neonatal rat ventricular myocytes" *Circ Res* 2003; 93(4):277-279

REBUFFÉ-SCRIVE M, SURWIT R, FEINGLOS M, KUHN C, RODIN J. "Regional fat distribution and metabolism in a new mouse model (C57BL/6J) of non-insulin-dependent diabetes mellitus". *Metabolism* 1993; 42(11):1405-9

RELLING DP, ESBERG LB, FANG CX, JOHNSON WT, MURPHY EJ, CARLSON EC, SAARI JT, REN J. "High-fat diet-induced juvenile obesity leads to cardiomyocyte dysfunction and upregulation of Foxo3a transcription factor independent of lipotoxicity and apoptosis" *J Hypertens* 2006; 24(3):549-61

REN J "Leptin and hyperleptinemia - from friend to foe for cardiovascular function" *J Endocrinol* 2004; 181(1):1-10

REN J, ZHU BH, RELLING DP, ESBERG LB, CEYLAN-ISIK AF. "High-fat diet-induced obesity leads to resistance to leptin-induced cardiomyocyte contractile response" *Obesity (Silver Spring)* 2008; 16(11):2417-23

RICQUIER D "Respiration uncoupling and metabolism in the control of energy expenditure" *Proc Nutr Soc* 2005; 64: 47-52

RIEMENS SC, SLUITER WJ, DULLAART RP “Enhanced escape of non-esterified fatty acids from tissue uptake: its role in impaired insulin-induced lowering of total rate of appearance in obesity and Type II diabetes mellitus” *Diabetologia* 2000; 43(4):416-426

ROGLANS N, VILÀ L, FARRÉ M, ALEGRET M, SÁNCHEZ RM, VÁZQUEZ-CARRERA M, LAGUNA JC. “Impairment of hepatic Stat-3 activation and reduction of PPARalpha activity in fructose-fed rats” *Hepatology* 2007; 45(3):778-88

RUBIO MA, SALAS-SALVADÓ J, BARBANY M, MORENO B, ARANCETA J, BELLIDO D, BLAY V, CARRARO R, FORMIGUERA X, FOZ M, DE PABLOS PL, GARCIA-LUNA PP, GRIERA JL, LOPEZ DE LA TORRE M, MARTINEZ JA, REMESAR X, TEBAR J, VIDAL J “Consenso SEEDO 2007 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad y el establecimiento de criterios de intervención terapéutica” *Rev Esp Obes* 2007; 7-48

RUDERMAN NB, SAHA KA, VAVVAS D, WITTERS LA “Malonyl-CoA, fuel sensing, and insulin resistance” *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 1999; 39: E1–E18

RUDERMAN NB, SAHA AK, KRAEGER EW “Minireview: malonil-CoA, AMP-activated protein kinase and adiposity” *Endocrinology* 2003; 144(12): 5166-5171

RUPPERT V, MEYER T “JAK-STAT signalling circuits in myocarditis and dilated cardiomyopathy” *Herz* 2007; 32: 474-481

RUTTER GU, SILVA XAVIER G, LECLERC I “Roles of AMP-activated protein kinase (AMPK) in mammalian glucose homeostasis” *Biochem J* 2003; 375: 1-16

RYYSY L, HÄKKINEN AM, GOTO T, VEKAVAARA S, WESTERBACKA J, HALAVAARA J, YKI-JÄRVINEN H “Hepatic fat content and insulin action on free fatty acids and glucose metabolism rather than insulin absorption are associated with insulin requirements during insulin therapy in type 2 diabetic patients” *Diabetes* 2000; 49:749–758

SCARPACE PJ, MATHENY M “Leptin induction of UCP1 gene expression is dependent on sympathetic innervation” *Am J Physiol Endocrinol. Metab* 1998; 275(38): E259–E264

SCARPACE PJ, MATHENY M, SHEK EW “Impaired leptin signal transduction with age-related obesity” *Neuropharmacology*, 2000; 39(10): 1872-1879

SCHRAUWEN P, HESSELINK M “UCP-2 and UCP-3 in muscle controlling body metabolism” *J Exp Biol* 2002; 205: 2275-2285

SCHWART MV, WOODS SC, PORTE Jr D, SEELEY RJ, BASKIN DG “Central nervous system control of food intake” *Nature* 2000; 404: 661-671

SELVETELLA G, LEMBO G “Mechanisms of cardiac hypertrophy” *Heart Failure Clin* 2005; 263-273

SERPILLON S, FLOYD BC, GUPTA RS, GEORGE S, KOZICKY M, NEITO V, RECCHIA F, STANLEY W, WOLIN MS, GUPTA SA "Superoxide production by NADPH oxidase and mitochondria is increased in genetically obese and hyperglycaemic rat heart and aorta before the development of cardiac dysfunction. The role of glucose-6-phosphate dehydrogenase-derived NADPH" *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 297: H153-H162

SERRA-MAJEM LI, RIBAS BARBA L, ARANCETA J, PEREZ RODRIGO C, SAAVEDRA SANTANA P, PEÑA QUINTANA L "Obesidad infantil y juvenil en España. Resultados de estudio EnKid (1998-2000)" *Med Clin (Barc)* 2003; 121: 725-732

SHEN X, ZHENG S, METREVELI NS, EPSTEIN PN "Protection of cardiac mitochondria by overexpression of Mn SOD reduces diabetic cardiomyopathy" *Diabetes* 2006; 55:798-805

SHIMABUKURO M, KOYAMA K, CHEN G, WANG MY, TRIEU F, LEE Y, NEWGARD CB, UNGER RH "Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissues" *PNAS* 1997; 94: 4637-4641

SIDHU JS, RAJAWAT YS, RAMI TG, GOLLOB MH, WANG Z, YUAN R, MARAN AJ, DEMAYO FJ, WEILBACHER D, TAFFET GE, DAVIES JK, CARLING D, KHOURY DS, ROBERTS R "Transgenic mouse model of ventricular preexcitation and atrioventricular reentrant tachycardia induced by an AMP-activated protein kinase loss-of-function mutation responsible of Wolf-Parkinson-White Syndrome" *Circulation* 2005; 111: 21-29

SIMON E, DEL BARRIO AS "Leptina y obesidad" *Anales Sin San Navarra*, 2002; 25(5): 53-64

SINHA MK, OPENTANOVA I, OHANNESIAN JP, KOLACZYNSKI JW, HEIMAN ML, HALE J, BECKER GW, BROWSHER RR, STEPHENS TW, CARO JF "Evidence of free and bound leptin in human circulation. Studies in lean and obese subject and Turing short-term casting" *J Clin Invest* 1996; 98(6): 1277-1282

Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO). Consenso SEEDO'2000 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad y el establecimiento de criterios de intervención terapéutica. *Med Clin (Barc)* 2000; 115: 587-597.

SOMOZA B, GUZMÁN R, CANO V, MERINO B, RAMOS P, DÍEZ-FERNÁNDEZ C, FERNÁNDEZ-ALFONSO MS, RUIZ-GAYO M. "Induction of cardiac uncoupling protein-2 expression and adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase phosphorylation during early states of diet-induced obesity in mice" *Endocrinology*, 2007; 148:924-931

STANLEY WC AND CHANDLER MP "Energy metabolism in the normal and failing heart: potential for therapeutic interventions" *Heart Failure Reviews*, 2002; 7:115-130

STANLEY WC, RECCHIA FA, LOPASCHUK GD "Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart" *Physiol Rev*. 2005; 85(3):1093-129

STEINBERG GR, RUSH JWE, DYCK DJ "AMPK expression and phosphorylation are increased in rodent muscle after chronic leptin treatment" *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 284: E648-E654

STEPHAN CN, BAILEY ST, BATH S, BROWN EJ, BANERJEE RR, WRIGHT CM, PATEL HR, AHIRA RS, LAZAR AM "The hormone resistin links obesity to diabetes" *Nature* 2001; 409: 307-312

STEPHAN CM, WANG J, WHITEMAN EL, BIRBAUM MJ, LAZAR MA "Activation of SOCS-3 by resistin" *Mol Cell Biol* 2005; 25(4): 1569-1575

SUDGEN MC, HOLNESS MJ "Interactive regulation of the pyruvate dehydrogenase complex and the carnitine palmitoyltransferase system" *FASEB J* 1994; 8: 54-61

SUDGEN MC, ORFALI KA, HOLNESS MJ "The pyruvate dehydrogenase complex: nutrient control and the pathogenesis of insulin resistance" *J Nutr* 1995; 125: 1746S-1752S

SURWIT RS, FEINGLOS MN, RODIN J, SUTHERLAND A, PETRO AE, OPARA EC, KUHN CM, REBUFFÉ-SCRIVE M "Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and A7J mice" *Metabolism*. 1995; 44(5):645-51

SZKUDELSKI T "Intracellular mediators in regulation of leptin secretion from adipocytes" *Physiol Rev*, 2007; 56: 503-512

TALBOT DA, BRAND MD "Uncoupling protein 3 protects aconitase against inactivation in isolated skeletal muscle mitochondria" *Biochim Biophys Acta* 2005; 1709(2):150-6

TARTAGLIA LA, DEMBSKI M, WENG S, DENG N, CULPERERJ, DEVOS R, GRAYSON JR, CAMPFIELD LA, CLARK FT, DEEDS J, MUIR C, SANKER S, MORIARTY A, MOORE KJ, SMUJKO JS, MAYS GG, WOOL EA, MONROE CA, TEPPER RI "Identification and expression cloning of a leptin receptor OB-R." *Cell* 1995; 83:1263-1271

TSCHÖP MH, HUI DY, HORVATH TL "Diet-induced leptin resistance: the heart of the matter" *Endocrinology* 2007; 148(3):921-923

UNGER RH, ZHOU YT, ORCI L "Regulation of fatty acid homeostasis in cells: Novel role of leptin" *PNAS* 1999; 96: 2327-2332

UNGER RH, ORCI L "Diseases of liporegulation: new perspective on obesity and related disorders" *FASEB J* 2001; 15(2):312-21

UNGER RH "Minireview: weapons of lean body mass destruction: the role of ectopic lipids in the metabolic syndrome". *Endocrinology*, 2003; 144: 5159-5165

UNGER RH "Hyperleptinemia: protecting the heart from lipid overload" *Hypertension* 2005; 45: 1031-1034

UOTANI S, BJORBAEK C, TORNOE J, FLIER JS. "Functional properties of leptin receptor isoforms: internalization and degradation of leptin and ligand-induced receptor downregulation" *Diabetes*, 48: 279-86, 1999

VAISSE C, HALAAS JL, HORVATH CM, DARNELL JR JE, STOFFEL M, FRIEDMAN JM "Leptin activation of STAT3 in the hypothalamus of wild-type and *ob/ob* mice but not *db/db* mice" *Nat. Genet* 1996; 14: 95-97

VALVERDE AM, BURKS DJ, FABREGAT I, FISHER TL, CARRETERO J, WHITE MF, BENITO M "Molecular mechanisms of insulin resistance in IRS-2-deficient hepatocytes" *Diabetes* 2003; 52(9):2239-48

VAN DER LEE K, WILLEMSSEN P, VAN DER VUSSE GJ, VAN BILSEN M "Effects of fatty acids on uncoupling protein 2 expression in the rat heart" *FASEB J* 2000; 14: 495-502

VAN DER VUSSE GJ, VAN BILSEN M, GLATZ JF. "Cardiac fatty acid uptake and transport in health and disease" *Cardiovasc Res.* 2000; 45(2):279-93

VAN HEEK M, COMPTON DS, FRANCE CF, TEDESCO RP, FAWZI AB, GRAZIANO MP, SYBERTZ EJ, STRADER CD, DAVIS HR JR. "Diet-induced obese mice develop peripheral, but not central, resistance to leptin." *J Clin Invest.* 1997; 99(3):385-90

VARO JJ, MARTINEZ-GONZALEZ MA, MARTINEZ JA "Prevalencia de obesidad en Europa" *ANALES Sis San Navarra* 2002; vol 25, suppl 1

VELASCO G, GÓMEZ DEL PULGAR T, CARLING D, GUZMÁN M "Evidence that the AMP-activated protein kinase stimulates rat liver carnitine palmitoyltransferase I by phosphorylating cytoskeletal components" *FEBS Lett* 1998; 439:317-320

VIDAL-PUIG A, SOLANES G, GRUJIC D, FLIER JS, LOWELL BB "UCP-3: an uncoupling protein homologue expressed preferentially and abundantly in skeletal muscle and brown adipose tissue" *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 235: 79-82

WAJCHENBERG BL "Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome" *Endocrine Rev.* 2000; 21(6): 697-738.

WANG MY, LEE Y, UNGER RH "Novel form of lipolysis induced by leptin" *J Biol Chem* 1999; 274(25): 17541-17544.

WANG ZW, PAN WT, LEE Y, KAKUMA T, ZHOU YT, UNGER RH "The role of leptin resistance in the lipid abnormalities of aging" *FASEB J*, 2001; 15: 108-114

WEGRZYN J, POTLA R, CHWAE YJ, SEPURIN NB, ZHANG Q, KOECK T, DERECKA M, SZCZEPANEK K, SZELAG M, GORNICKA A, MOH A, MOGHADDAS S, CHEN Q, BOBBILI S, CICHY J, DULAK J, BAKER DP, WOLFMAN A, STUEHR D, HASSAN MO, FU XY, AVADHANI N, DRAKE JI, FAWCETT P, LESNEFSKY EJ, LARNER AC "Function of mitochondrial STAT3 in cellular respiration" *Science*, 2009; 323(5915): 793-797

WEISS R "Fat distribution and storage: how much, where, and how?" *Eur J Endocrinol* 2007; 157: S39-S45

WITTING PK, RAYNER BS, WU BJ, ELLIS NA, STOCKER R "Hydrogen peroxide promotes endothelial dysfunction by stimulating multiple sources of superoxide anion radical production and decreasing nitric oxide bioavailability" *Cell Physiol Biochem* 2007; 20: 255-268

WOJTASZEWSKI JF, JØRGENSEN SB, HELLSTEN Y, HARDIE DG, RICHTER EA "Glycogen-dependent effects of 5-aminoimidazole-4-carboxamide (AICA)-riboside on AMP-activated protein kinase and glycogen synthase activities in rat skeletal muscle" *Diabetes* 2002; 51(2):284-92

WOLFGANG MJ, CHA SH, SIDHAYE A, CHOHNAN S, CLINE G, SHULMAN GI, LANE MD "Regulation of hypothalamic malonyl-CoA by central glucose and leptin" *PNAS USA* 2007;104(49):19285-90

WRIGHT JJ, BUCHANAN J, BOUDINA S, SENA S, BAKIRTZI K, THEOBALD HA, COOKSEY RC, KANDROR KV, ABEL ED "Mechanisms for increased myocardial fatty acid utilization following short-term high-fat diet". *Cardiovasc Res* 2009; 82:351-360

YANG R, BAROUCH LA "Leptin Signaling and Obesity. Cardiovascular Consequences" *Circ Res*, 2007; 101: 545-559

YUSUF S, HAWKEN S, OUNPUUS S, DANS T, AVEZUM A, LANAS F, McQUEEN m, BUDAJ A, PAIS P, VARIGOS J, LISHENG L "Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study)" *Lancet*, 2004; 364(9438): 937-952

ZAMORA E, LUPÓN J, URRUTIA A, GONZÁLEZ B, MAS D, PASCUAL T, DOMINGO M, VALLE V "¿El índice de masa corporal influye en la mortalidad de los pacientes con insuficiencia cardiaca?" *Rev Esp Cardiol*, 2007; 60(11): 1127-1134

ZANG Y, PROENCA R, MAFFEI M, BARONE M, LEOPOLD L, FRIEDMAN JM "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue" *Nat*, 1994; 372, 425-432

ZENG P, JI P, MA Z, LIN T, XIN L, LUI H, LIANG X, LIN J " Therapeutic effect of pueranin on non-alcoholic rat fatty liver by improving leptin signal transduction through Jak/STAT3 pathway" *Am J Clin Med*, 2009; 37(1): 69-83

ZHAI P, GAO S, HOLLE E, YU X, YATANI A, WAGNER T, SADOSHIMA J "Glycogen synthase kinase-3alpha reduces cardiac growth and pressure overload-induced cardiac hypertrophy by inhibition of extracellular signal-regulated kinases" *J Biol Chem* 2007;282(45):33181-91

ZHOU Y-T, SHIMABUKURO M, KOYAMA K, LEE Y, WANG M-Y, TRIEU F, NEWGARD CB, UNGER RH "Induction by leptin of uncoupling protein -2 and enzymes of fatty acid oxidation" *Proc Natl acad Sci USA* 1997; 94: 6386-6390

ZHOU YT, GRAYBURN P, KARIM A, SHIMABUKURO M, HIGA M, BAETEN D, ORCI L, UNGER RH "Lipotoxic heart disease in obese rats: Implications for human obesity" *PNAS* 2000 97 (4):1784-1789

APÉNDICE

Publicaciones:

- **SOMOZA B*, GUZMÁN R*, CANO V, MERINO B, RAMOS P, DíEZ-FERNÁNDEZ C, FERNÁNDEZ-ALFONSO MS, RUIZ-GAYO M** “Induction of cardiac uncoupling protein-2 expression and adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase phosphorylation during early states of diet-induced obesity” *Endocrinology* 2007; 148:924-931

*: Igual contribución

A este trabajo, la revista *Endocrinology* del mes de marzo dedica el comentario editorial: Tschöp MT, Hui DY, Horvath TL. “Diet-induced leptin resistance: the heart of the matter” *Endocrinology* 2007; 148 (3):924-931.

- **GUZMÁN-RUIZ R, SOMOZA B, GIL-ORTEGA M, MERINO B, CANO V, ATTANÉ C, CASTAN-LAURELL I, VALET P, FERNÁNDEZ-ALFONSO MS, RUIZ-GAYO M.** “Sensitivity of Cardiac Carnitine Palmitoyltransferase to Malonyl-CoA Is Regulated by Leptin. Similarities with a Model of Endogenous Hyperleptinemia” *Endocrinology*. 2010; 151(3): 1010-1018.

Induction of Cardiac Uncoupling Protein-2 Expression and Adenosine 5'-Monophosphate-Activated Protein Kinase Phosphorylation during Early States of Diet-Induced Obesity in Mice

Beatriz Somoza,* Rocío Guzmán,* Victoria Cano, Beatriz Merino, Pilar Ramos, Carmen Díez-Fernández, Maria S. Fernández-Alfonso, and Mariano Ruiz-Gayo

Departamento de Farmacología, Tecnología y Desarrollo Farmacéutico (B.S., R.G., V.C., B.M., C.D.-F., M.R.-G.) and Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular, Facultad de Farmacia (P.R.), Universidad San Pablo-Ceu, 28668 Madrid, Spain; and Unidad de Cartografía Cerebral, Instituto Pluridisciplinar (M.S.F.-A.), Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

The objective of this work was to characterize the adaptation of cardiac metabolism to a lipid overload in a model of diet-induced obesity (DIO) in mice. After 8 wk dietary treatment, mice receiving a high-fat diet exhibited an increase in the amount of adipose tissue, accompanied by a surge in plasma leptin concentration (from 5.4–16.0 ng/ml). This was associated with: 1) an induction of uncoupling protein-2 (120%), 2) an increase in the phosphorylated form of AMP-activated protein kinase (120%), and 3) a reduction in lactate concentration and lactate dehydrogenase activity in myocardial tissue (40%). Because DIO induces leptin resistance, we analyzed leptin re-

ceptor functionality by measuring phospho-signal transducer and activator of transcription 3 in response to acute leptin (1 mg/kg). We observed that leptin receptor signaling remained unaltered within the heart but was fully impaired within the hypothalamus. Taken together, these data show that during DIO development, there is a metabolic shift in the heart aimed at increasing fatty acid oxidation to the detriment of carbohydrates. This effect seems to be leptin-dependent, suggesting that the increased adiposity observed during the onset of obesity might contribute to impairing ectopic lipidic deposition in the heart. (*Endocrinology* 148: 924–931, 2007)

OVERNUTRITION CAUSES ADIPOCYTES to store the surplus fuel in the form of triglycerides (TGs) for retrieval during periods of caloric need. Nonadipose tissues have a limited capacity of TG storage. Indeed, an excessive lipid deposition in organs and tissues such as liver, skeletal muscle, pancreas, or heart has been related to the development of fatty liver, insulin resistance, pancreatic dysfunction, or lipid cardiomyopathy (1). Energy-dissipating mechanisms, together with increased β -oxidation of fatty acids (FAs), are key elements of metabolic adaptation to an elevated intake of fat and are crucial to understand alterations linked to the development of obesity. In this context, uncoupling proteins (UCPs) impair the storage of energy as high-energy phosphates, facilitate heat dissipation, and might contribute to preventing ectopic accumulation of lipids and lipotoxicity (2–7).

High-fat (HF) diets have been shown to induce fat accumulation and overweight in mice prone to diet-induced obesity (DIO). Elevation of plasma leptin concentration is de-

tected early after HF diet instauration (8) in accordance with the lipostatic action of this adipocyte-derived hormone, which acts both on peripheral and central hypothalamic targets. In fact, leptin elicits a satiating effect, up-regulates FA oxidative capacity, and down-regulates the activity of lipogenic enzymes. Leptin also induces the expression of mitochondrial UCPs in different tissues such as brown adipose tissue (9) or β -cells (2). Numerous works carried out in rodents made hyperleptinemic by means of genetic manipulation suggest that leptin might limit ectopic accumulation of lipids, thus protecting lean tissues against lipotoxicity (1, 7, 10–12). Nevertheless, DIO mice develop progressive leptin resistance within the hypothalamus (8, 11, 12), suggesting a desensitization of leptin receptors or leptin transport from the periphery to the brain. Leptin resistance probably also concerns peripheral tissues, but this issue has not been properly established.

Obesity is an independent risk factor for cardiac disease (13) that has been associated with left ventricular hypertrophy, lipid cardiomyopathy, heart failure, and sudden death (14). A substantial amount of work regarding cardiac changes in obese models has contributed to understanding how the heart adapts to obesity. Most data have been obtained by using genetic models of obesity, *i.e.* leptin deficiency (14–16) or leptin signaling disruption (14), as well as genetically engineered rodents (7). However, there are no data regarding the progress of cardiac adaptation to diets containing an elevated fat content, which, in our eyes, more closely resembles the development of human obesity. Our

First Published Online November 2, 2006

* B.S. and R.G. contributed equally to this study.

Abbreviations: AMPK, AMP-activated protein kinase; DIO, diet-induced obesity; FA, fatty acid; HF, high fat; LDH, lactate dehydrogenase; LF, low fat; pAMPK, phosphorylated AMPK; pSTAT3, phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3; TG, triglyceride; UCP, uncoupling protein.

Endocrinology is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.

rationale to design this study was that a diet containing an elevated fat content should initially activate mechanisms aimed at buffering the excess lipid intake by increasing: 1) fat stores in adipose tissue and 2) mitochondrial uncoupling and/or oxidative mechanisms in the heart. If leptin plays a role in the development of metabolic changes in the heart, we should detect a parallelism between leptin responsiveness and its ability to activate metabolic uncoupling and to limit lipid deposition. To evaluate early changes in cardiac metabolic adaptation, the study was carried out over a period of 8 wk. We determined cardiac levels of: 1) UCP-2, 2) phosphorylated AMP-activated protein kinase (pAMPK) and AMPK, and 3) lactate content and lactate dehydrogenase (LDH) activity. We also analyzed the eventual contribution of leptin to metabolic changes evoked by a fat overload.

Materials and Methods

Animals and chow

Four-week-old male C57BL/6J mice (CRIFA, Barcelona, Spain) weighing 16–18 g were housed under a 12-h light/12-h dark cycle, in a temperature-controlled room (22 C) with standard food and water *ad libitum*, in accordance with the European Communities Council Directive (86/609/EEC) for the care and use of laboratory animals. After 1 wk, animals were divided into two groups with similar average body weight, housed six to nine per cage, and assigned either to a low-fat (LF) or HF diet. LF (D12450B, 10 kcal % fat, 70 kcal % carbohydrates, and 20 kcal % protein; 3.85 kcal/g) or HF (D12451, 45 kcal % fat, 35 kcal % carbohydrates, and 20 kcal % protein; 4.73 kcal/g) diets were supplied by Research Diets, Inc. (New Brunswick, NJ) and will be referred to as LF and HF, respectively.

Experimental design

HF-fed and their respective LF control mice had free access to food for either 4 or 8 wk. On the last day, mice were killed by decapitation between 1000 and 1200 h. Truncal blood was collected in chilled EDTA-coated polypropylene tubes and heart as well as lumbar, and mesenteric adipose tissue was dissected, weighed, and stored at -80°C .

Plasma measurements

Plasma leptin concentration was analyzed using a specific RIA kit for murine leptin (Linco Research, St. Charles, MO) (4.9% intraassay variation, 3.3% interassay variation). Insulin was determined by means of a specific ELISA kit for mouse insulin (Mercodia, Denmark) (2.2% intraassay variation, 4.9% interassay variation). Glucose was measured by a spectrophotometric method (Glucose Trinder Method, Roche Applied Science, Indianapolis, IN). TGs and free FAs were determined using the GPO (BIOLABO, Maizy, France) and ACS-ACOD (Wako Bioproducts, Richmond, VA) methods, respectively.

Western blot for UCP-2, pAMPK, and phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3 (pSTAT3)

UCP-2, pAMPK, and pSTAT3 were measured in whole cardiac left ventricle. Briefly, tissues were homogenized in ice-cold buffer containing 0.42 M NaCl, 20 mM HEPES (pH 7.9), 1 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, 20% glycerol, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin, 20 mM sodium fluoride, 1 mM trisodium orthovanadate, and 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride. Tubes containing homogenates were frozen at -80°C and thawed at 37°C three consecutive times, then centrifuged for 10 min at 4°C . Equivalent amounts of proteins (50 μg) present in the supernatant were loaded in Laemli buffer [50 mM Tris (pH 6.8), 10% sodium dodecyl sulfate, 10% glycerol, 5% mercaptoethanol, and 2 mg/ml blue bromophenol] and size-separated in 15% SDS-PAGE. Proteins were transferred to polyvinylidene difluoride membranes (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) using a transblot apparatus (Bio-Rad, Hercules, CA). For immunoblotting,

membranes were blocked with 5% nonfat dried milk in Tween-PBS for 1 h. Primary antibodies against UCP-2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA; 1/100 final dilution), pSTAT3 (Tyr⁷⁰⁵) (Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA; 1/100 final dilution), STAT3 (Santa Cruz Biotechnology; 1/1000 final dilution), pAMPK- α (Thr¹⁷²) (Cell Signaling Technology; 1:1000 final dilution), and AMPK- α (Cell Signaling Technology; 1:1000 final dilution) were applied at the convenient dilution overnight at 4°C . After washing, appropriate secondary antibodies (anti-goat IgG-peroxidase conjugated) were applied for 1 h at a dilution of 1/15,000. Blots were washed, incubated in commercial enhanced chemiluminescence reagents (GE Healthcare), and exposed to autoradiographic film. To prove equal loadings of samples, blots were reincubated with β -actin antibody (Affinity Bioreagents, Golden, CO). Films were scanned using a GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad), and blots were quantified using Quantity One software (Bio-Rad). Values for UCP-2 were normalized with β -actin to account for variations in gel loading. Values for pSTAT3 and pAMPK were normalized with STAT3 and AMPK, respectively.

Determination of LDH activity

Left ventricular tissue (25 mg) was weighed and then homogenized in 0.5 ml ice-cold 0.1 M phosphate buffer (pH 7.8) containing 0.1 mM MgSO_4 , 2 mM EDTA, and 0.2% BSA. Enzyme activity was determined by the SFBC modified method (BIOLABO). Briefly, homogenates were diluted (1:4) in saline and incubated at 37°C . Absorbance (340 nm) was recorded after 30, 60, and 120 sec and Δ absorbance per minute was calculated. Enzymatic activity was expressed in international units per milligram of protein.

Determination of lactate concentration

Lactate concentration was measured in the same homogenates prepared for LDH activity determination using an enzymatic colorimetric method (Spinreact, Granada, Spain). Briefly, 2 μl homogenate was diluted in 200 μl PIPES 50 mM (pH 7.5) containing 4-chlorophenol (4 mM), lactate oxidase (800 U/liter), peroxidase (2000 U/liter), and 4-aminophenazone (0.4 mM), then incubated 10 min at room temperature, and absorbance (505 nm) was recorded (2.1% intraassay variation, 3.1% interassay variation). Lactate concentration was expressed in millimoles per milligram of protein.

Determination of heart TGs

TG content in the heart was determined following the method described by Unger (1). Briefly, 20 mg left ventricle was homogenized in a solvent mixture containing 40 μl 2 mM NaCl/20 mM EDTA/50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4), 40 μl *tert*-butylic alcohol, and 20 μl Triton X-100/methanol mixture (1:1). TGs were measured with a Sigma diagnostic kit.

Assessment of leptin resistance

Recombinant murine leptin (1 mg/kg) or saline was administered at 0900 h. After 90 min, mice were killed by decapitation, and hearts and hypothalami were dissected and stored at -80°C until assay. Tissues were prepared for Western blotting as described above.

Statistics

Body weight and food intake variations were analyzed by a two-way ANOVA. The factors of variation were pharmacological treatment and time. Other parameters were analyzed by a one-way ANOVA, followed by Newman-Keuls *post hoc* test. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

Results

Effect of a HF diet on body weight, adiposity, and plasma parameters

Overweight was induced in C57BL/6J mice by exposure to a diet in which 45% of the calories were derived from fat.

A control group was fed with LF chow, which only yielded 10% of the calories from fat. The study was carried out over a period of 8 wk to determine early changes in cardiac metabolic adaptation. As illustrated in Fig. 1A, the difference in body weight was already statistically different after 4 wk dietary treatment and progressively increased until wk 8 [two-way ANOVA, $F_{(1,81)} = 18,519$; $P < 0.001$ for diet, $F_{(2,81)} = 148,362$; $P < 0.001$ for time, $F_{(2,81)} = 3373$; $P < 0.05$ for the interaction]. During this period, food intake (Fig. 1B) was lower in the HF group [two-way ANOVA, $F_{(1,81)} = 207,395$; $P < 0.001$ for diet, $F_{(2,81)} = 42,967$; $P < 0.001$ for time, $F_{(2,81)} = 19,654$; $P < 0.001$ for the interaction], although the average kcal consumption was equivalent both in LF and HF groups (Fig. 1C), indicating that the increase in body weight was related to the type of food consumed rather than to a supplementary intake of kcal. As summarized in Table 1, the HF diet induced a significant gain in adipose tissue, which increased by more than 350% in the case of lumbar adipose tissue after 8 wk HF. Surprisingly, heart weight exhibited a significant increase after 4 wk dietary treatment [$F_{(1,14)} = 9331$; $P < 0.01$] that was not observed after 8 wk of the fat diet [$F_{(1,28)} = 2801$; $P = 0.1$]. Serum analysis revealed that 8 wk HF induced significant hyperleptinemia (Table 2) without changes at this time point in other biochemical parameters,

including free FAs. Simple regression analysis revealed a significant correlation [$F_{(1,13)} = 229,014$; $P < 0.001$; $r = 0.97$] between plasma leptin concentration and the amount of lumbar adipose tissue.

Determination of heart TGs

One-way ANOVA revealed an effect of diet on the amount of TGs in left ventricle, which increased from 1.83 ± 0.24 mg/g tissue to 2.59 ± 0.28 mg/g tissue [$F_{(1,24)} = 4197$; $P < 0.05$] after 4 wk dietary treatment. In 8-wk-treated animals, TG content was similar in control (3.29 ± 0.49 mg/g tissue) and HF (2.90 ± 0.51 mg/g tissue) animals.

Cardiac UCP-2 is increased after 8 wk HF diet

As shown in Fig. 2A, Western blot revealed that the expression of UCP-2 is similar between groups after 4 wk dietary treatment. However, after 8 wk, UCP-2 expression was significantly increased in the HF group compared with the LF diet group [$F_{(1,14)} = 7912$; $P < 0.05$]. Changes in UCP-2 expression after 8 wk positively correlated with the amount of adipose tissue (Fig. 2B) [$F_{(1,14)} = 53,425$; $P < 0.001$] and with plasma leptin levels (Fig. 2C) [$F_{(1,6)} = 60,658$; $P < 0.01$].

pAMPK is increased in the heart after 8 wk HF diet

As illustrated in Fig. 3, AMPK expression was similar at 4 and 8 wk HF dietary treatment. In contrast, basal phosphorylation (pAMPK-Thr¹⁷²) of this enzyme was significantly increased by about 2.2-fold after 8 wk HF feeding [$F_{(1,13)} = 6361$; $P < 0.01$].

Lactate concentration and LDH activity are decreased in the heart after 8 wk HF diet

Figure 4 illustrates the influence of a HF diet on cardiac lactate concentration and LDH activity. One-way ANOVA revealed a significant increase in lactate content [$F_{(1,32)} = 10,035$; $P < 0.01$] 4 wk after dietary treatment (Fig. 4A) which was concomitant with the enhancement of LDH activity [$F_{(1,31)} = 6749$; $P < 0.05$] (Fig. 4B). In contrast, lactate concentration was significantly lower in mice maintained on the HF diet for 8 wk [$F_{(1,31)} = 6749$; $P = 0.058$] (Fig. 4C). Accordingly, LDH activity also decreased in this experimental group [$F_{(1,17)} = 7114$; $P < 0.05$] (Fig. 4D). The reduction in lactate concentration showed a negative correlation with the ratio pAMPK/AMPK [$F_{(1,7)} = 6851$; $P < 0.05$] (Fig. 5A) as well as with the expression of UCP-2 [$F_{(1,8)} = 8.004$; $P < 0.05$] (Fig. 5B) after 8 wk HF diet.

pSTAT3 is increased in the heart after 8 wk HF diet but not in the hypothalamus

To assess the development of leptin resistance after 8 wk HF diet, we analyzed the responsiveness to acute leptin in both cardiac tissue and hypothalamus. Recombinant murine leptin (1 mg/kg) was administered ip to groups of LF- and HF-fed mice and phosphorylated STAT3 measured 90 min after leptin administration by means of Western blot. Two-way ANOVA revealed that the type of diet used had no effect

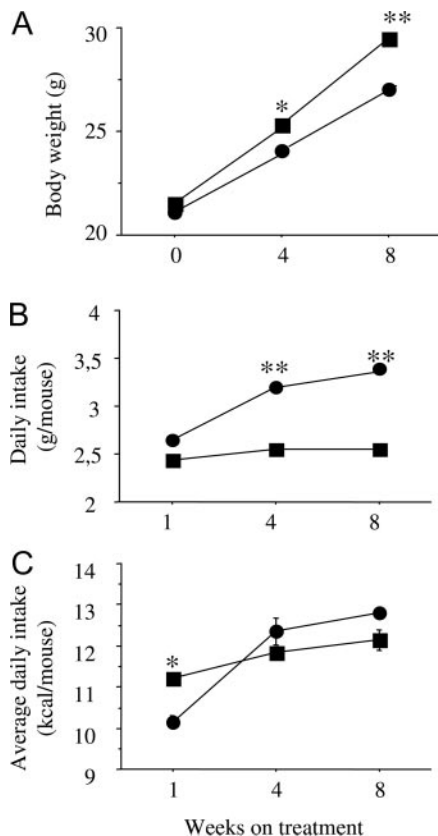


FIG. 1. Time course of body weight evolution and daily food intake. A, Effect of LF (black circles) and HF (black squares) diets in the evolution of body weight during a period of 8 wk. B, Idem in daily food intake. C, Effect of dietary treatment on kcal intake. Values are means \pm SEM of 15–18 individual values. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$, Newman-Keuls test.

TABLE 1. Effect of dietary treatment on weight of lumbar and mesenteric adipose tissue, liver, and heart

| | 4 Wk on diet | | 8 Wk on diet | |
|--------------------------------|--------------|---------------------------|--------------|---------------------------|
| | LF diet | HF diet | LF diet | HF diet |
| Lumbar adipose tissue (mg) | 76.6 ± 4.5 | 152.1 ± 15.3 ^b | 99.8 ± 8.8 | 377.8 ± 25.5 ^c |
| Mesenteric adipose tissue (mg) | 297.8 ± 12.0 | 317.0 ± 19.5 | 293.2 ± 22.5 | 397.5 ± 29.5 ^a |
| Liver (g) | 1.01 ± 0.02 | 0.91 ± 0.03 | 0.92 ± 0.02 | 0.89 ± 0.04 |
| Heart (mg) | 118.1 ± 3.3 | 138.6 ± 4.9 ^c | 119.1 ± 1.8 | 126.3 ± 4.2 |

^a $P < 0.05$; ^b $P < 0.01$; ^c $P < 0.001$ compared with their corresponding matched control groups. Newman-Keuls test.

on the basal concentration of cardiac pSTAT3 [$F_{(1,11)} = 0.497$; not significant], but all LF- and HF-fed mice exhibited increased values of pSTAT3 after acute treatment with leptin [$F_{(1,11)} = 8799$; $P < 0.05$], without a significant interaction between the type of diet and pharmacological treatment [$F_{(1,11)} = 0.019$; not significant]. These results are shown in Fig. 6, A and B, and demonstrate that leptin receptors in the heart are responsive to leptin. In contrast, peripheral leptin administration had no effect on STAT3 phosphorylation in the hypothalamus of HF-fed mice (Fig. 6C).

Discussion

This study documents the importance of dietary composition on changes in cardiac metabolism detected early after the onset of an elevated intake of saturated fat. We demonstrate that a HF diet up-regulates the expression of UCP-2, enhances the activity of metabolic pathways involved in FA oxidation, and decreases the oxidation rate of carbohydrates in the heart. These effects are not apparently linked to a caloric surplus because daily caloric intake was similar in LF- and HF-treated animals, but seem to be related to the hyperleptinemia induced by the HF diet. The major new finding of this study is that cardiac metabolic adaptation to HF occurs in parallel with the increase in plasma leptin concentration. Interestingly, cardiac responsiveness to leptin was fully conserved 8 wk after HF diet, whereas leptin resistance within the hypothalamus appeared early during the development of DIO (12; this study). Data presented in this work demonstrate that physiopathological mechanisms regulating hypothalamic and peripheral leptin receptor responsiveness are different and suggest that leptin plays a key role in adaptation to a lipid overload in the heart by an extrahypothalamic mechanism.

UCPs act as proton carriers regulating mitochondrial membrane potential. In the case of UCP-1, which is mainly expressed in brown adipose tissue, this effect results in heat

dissipation. In addition to the role of UCP-2 in thermogenesis, numerous studies suggest the involvement of these proteins in adaptive mechanisms aimed at improving FA use (2, 4; for review, see Ref. 17) and at limiting fat accumulation in non adipose tissues (1; for review, see Ref. 7). For example, mitochondrial uncoupling appears to play an important role in cardiac metabolic adaptation in newborn animals as a consequence of the elevated lipid/carbohydrate ratio in milk compared with the fetal diet (18). A similar metabolic adaptation to a lipid overload might be occurring in our dietary treatment.

In postprandial periods, about 60–90% of cardiac ATP production is derived from FA oxidation and only 10–40% from lactate and glycolysis. Lactate uptake is a major source of pyruvate, which is oxidized by LDH yielding pyruvate (19). The relative proportion between FA and glucose/lactate as a source of ATP is dependent on arterial substrate concentration and hormone levels (Ref. 20 and references cited therein). In consequence, an excess of dietary lipids would enhance FA metabolism to the detriment of lactate and glucose. Our data suggest that this metabolic adaptation occurs gradually. We observed that both cardiac lactate concentration and LDH activity are increased after 4 wk dietary treatment. In later stages (8 wk), lactate uptake and oxidation seem to decline, suggesting that the ability of the heart to manage FA is adapted to the HF diet. Interestingly, at this time point, lactate concentration negatively correlated with UCP-2 expression ($r = 0.73$), suggesting improved FA use. As further confirmation, we also observed an increase of pAMPK. AMPK is a key enzyme in energetic metabolism, and an increase in pAMPK leads to the stimulation of β -oxidation and inhibition of lipogenesis. Basal pAMPK is also increased in skeletal muscle after HF dietary treatment (21). As occurs with UCP-2, lactate concentration also correlated negatively with pAMPK ($r = 0.72$), indicating that the decline in lactate uptake occurs when the ability of the heart to

TABLE 2. Effect of dietary treatment on plasmatic parameters

| | 4 Wk on treatment | | 8 Wk on treatment | |
|---------------------------------|-------------------|--------------|-------------------|-------------------------|
| | LF diet | HF diet | LF diet | HF diet |
| Insulin ($\mu\text{g/liter}$) | 0.75 ± 0.07 | 0.98 ± 0.09 | 0.70 ± 0.08 | 0.89 ± 0.06 |
| Leptin (ng/ml) | 6.4 ± 0.8 | 8.8 ± 3.9 | 5.4 ± 0.3 | 16.0 ± 1.7 ^a |
| Glucose (mg/dl) | 148.5 ± 12.4 | 157.7 ± 4.3 | 157.4 ± 3.9 | 157.7 ± 3.9 |
| TGs (mg/dl) | 85.2 ± 10.6 | 65.4 ± 6.2 | 64.1 ± 6.0 | 69.5 ± 3.6 |
| Free FAs (mM) | 0.78 ± 0.06 | 0.67 ± 0.02 | 0.70 ± 0.06 | 0.61 ± 0.02 |
| Glycerol (μM) | 680.7 ± 41.6 | 623.3 ± 38.2 | 622.5 ± 46.2 | 747.5 ± 44.5 |

^a $P < 0.01$ compared with the corresponding matched control groups. Newman-Keuls test.

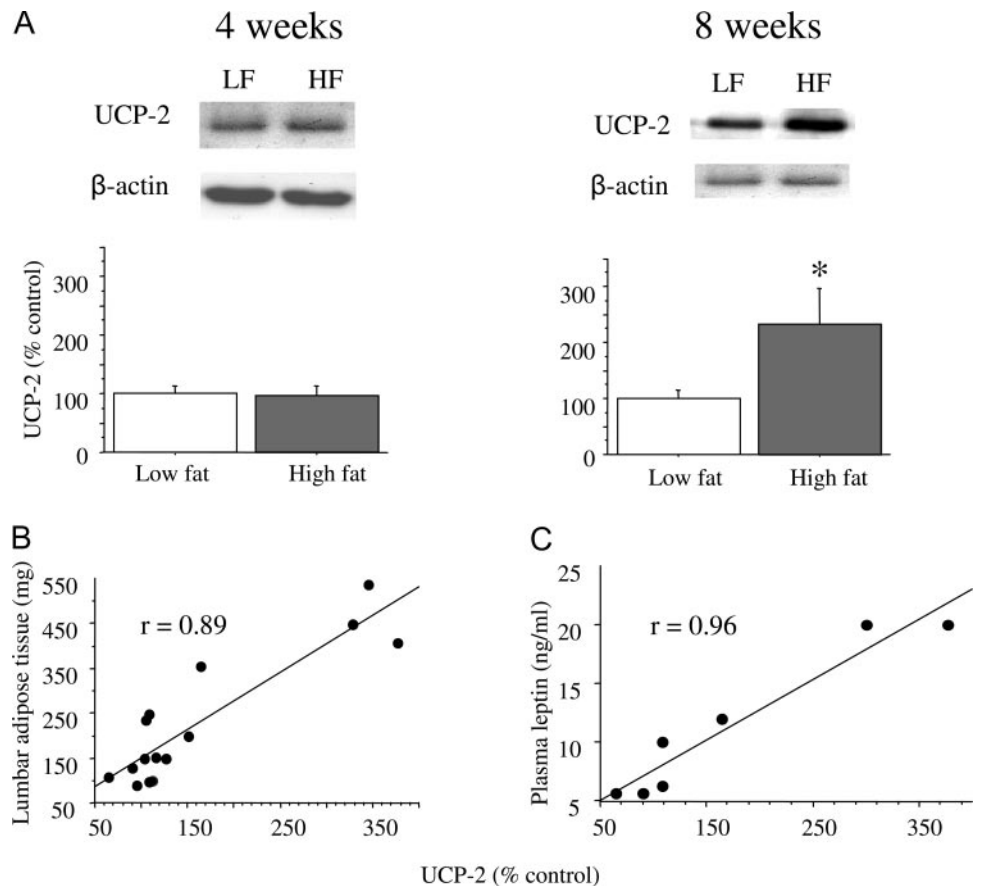


FIG. 2. A, Effect of a HF diet on protein expression of cardiac UCP-2, measured after 4 and 8 wk dietary treatment. *Microphotographs* illustrate representative Western blots of UCP-2 ($n = 6-8$ animals/treatment). *Diagram bars* show the result of densitometric analysis of UCP-2 immunoblots, expressed as percentage of UCP-2 in the control group. Data are presented as means \pm SEM. Statistical analyses were performed with one-way ANOVA followed by a Newman-Keuls test. *, $P < 0.05$ compared with the control group. B, Correlation between UCP-2 expression and the amount of lumbar adipose tissue. C, Correlation between UCP-2 expression and plasma leptin concentration. Individual values in B and C correspond to animals receiving a HF diet during 8 wk.

metabolize FA increases. Interestingly, cardiac TGs were slightly increased after 4 wk HF diet but returned to control values after 8 wk. These changes occurred in parallel with changes in cardiac weight. This normalization is coincident with the increase in all plasma leptin, adiposity, AMPK phos-

phorylation, and UCP-2 expression. Taken together and despite the lack of direct functional measures of fat oxidation, all these changes suggest that β -oxidation becomes a more important source of energy in HF than in LF-fed mice to the detriment of pyruvate oxidation. As additional support for the role of leptin, studies carried out in leptin-deficient mice, which exhibit elevated content of cardiac TGs (1), have provided evidence that leptin repletion reverses cardiac hypertrophy (14), suggesting that leptin is a relevant mediator for cardiac homeostasis.

A main finding in this work is the link between the surge in both adiposity and plasma leptin concentration and changes in cardiac UCP-2, pAMPK, and TGs. In this study, hyperleptinemia associated with the HF diet might be responsible, at least partially, for metabolic uncoupling in the heart. The positive correlation between plasma leptin concentration and the expression of UCP-2 ($r = 0.98$) detected 8 wk after the HF diet strongly supports a role for leptin in the metabolic adaptation observed in this study. Indeed, UCP-2 remains unaltered after 4 wk of dietary treatment, when plasma leptin values were still similar both in LF- and HF-fed mice. In fact, HF diets are known to induce UCP-2 expression in the heart (22), and a role for leptin in modulating UCP-2 expression in adipose tissue and skeletal muscle has been suggested in models of transitory hyperleptinemia induced by exogenous administration of leptin (23). Expression of UCP-2 has been shown to be up-regulated in rats made hyperleptinemic by means of leptin gene transfer, both in

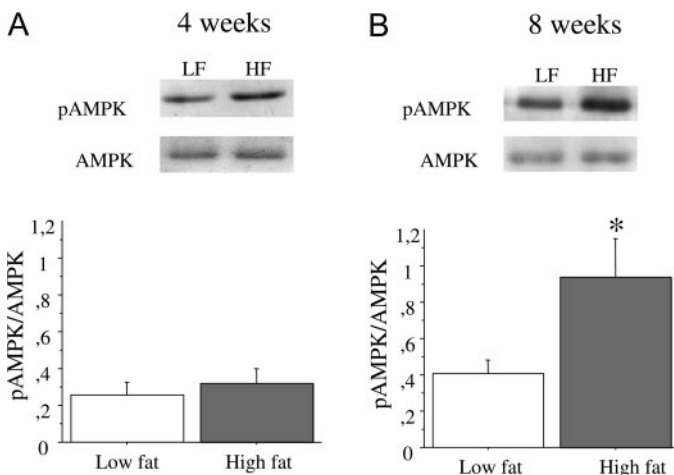
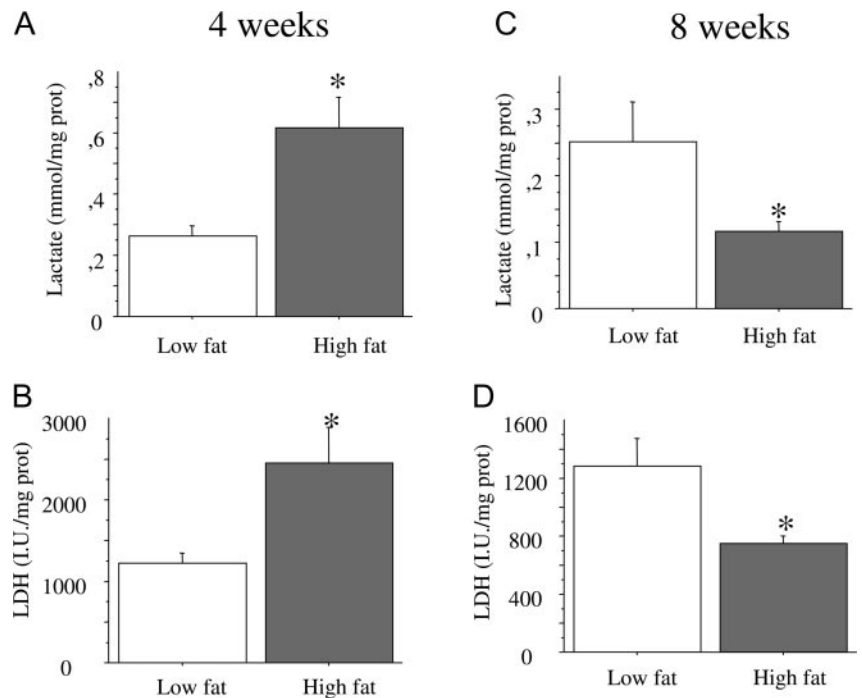


FIG. 3. Cardiac expression of AMPK and phosphorylated AMPK-Thr¹⁷² (pAMPK) after 4 (A) and 8 (B) wk of LF or HF diet. *Top*, Representative Western blots of phospho-AMPK and total AMPK ($n = 6-7$ animals/treatment). *Bottom*, Level of phosphorylation of AMPK expressed as the mean \pm SEM of the ratio pAMPK/AMPK ($n = 7-9$ animals). Statistical analyses were performed with one-way ANOVA followed by a Newman-Keuls test. *, $P < 0.05$ compared with the control group.

FIG. 4. Effect of a HF diet on cardiac lactate concentration (millimoles per milligram of protein) and LDH activity (international units per milligram of protein). A and B, Effect of 4 wk dietary treatment. C and D, Effect of 8 wk dietary treatment. Results are expressed as means \pm SEM of 15–17 individual values. Statistical analyses were performed with one-way ANOVA followed by a Newman-Keuls test. *, $P < 0.05$ compared with the control group.



β -cells (2) and adipocytes (24). Nevertheless, the role of leptin in regulating UCP-2 expression is far from being well characterized and seems to depend on the experimental conditions used. For example, studies carried out in *ob/ob* (leptin-deficient) mice suggest that the elevated expression of UCP-2

observed in the adipose tissue of these animals is linked to the absence of leptin signal (25). As a further confirmation, Commins *et al.* (26) have reported a lack of effect of exogenous leptin in UCP-2 expression in white adipose tissue of *ob/ob* mice. As an alternative, biochemical changes detected in HF mice might be linked to the type of food rather than to the increase of fat mass and/or leptin. However, studies carried out after 72 h of dietary treatment (at this time point, both adipose tissue and plasma leptin remain unchanged) did not evidence changes in cardiac TGs, lactate, or LDH activity (data not shown). This supports the importance of adipocytokines in the metabolic changes characterized in this study. In any case, mechanistic studies are needed to provide a definitive cause-effect relationship between plasma leptin concentration and UCP-2 expression.

In addition to the correlation between leptin and UCP-2 expression, our study yields additional data supporting the role of leptin. Leptin receptors are expressed in cardiac myocytes (27, 28), and we have demonstrated that these receptors are functionally coupled to the JAK/STAT signaling pathway (this study). Interestingly, although leptin signaling within the hypothalamus is disrupted early after HF instauration (12; this study), responsiveness of leptin receptors remains unaltered after 8 wk HF. This result demonstrates dissociation between central and peripheral resistance to leptin. Studies carried out in DIO models together with clinical data suggest that leptin resistance is linked to the impairment of leptin transport from the periphery to the brain, thus involving Ob-Ra rather than Ob-Rb receptors. Our results fit well with this hypothesis; thus, peripheral Ob-Rb receptors, which are accessible to circulating leptin, conserve leptin responsiveness longer than central receptors. It has to be noted nevertheless that the lack of leptin inputs in the central nervous system can also affect peripheral signals, *i.e.*

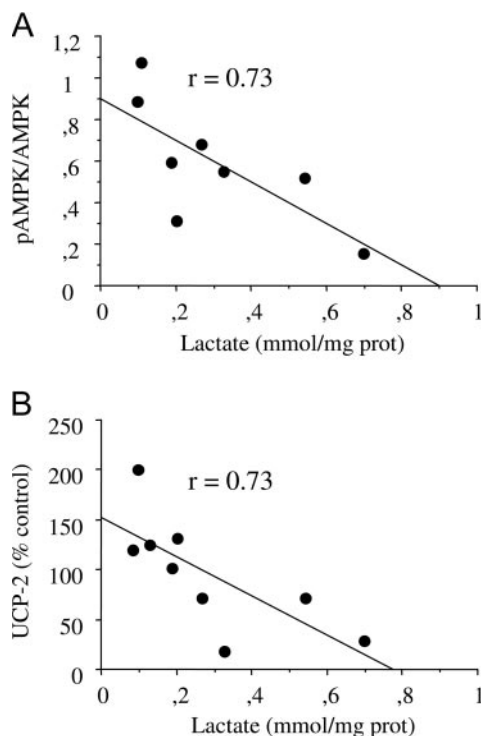


FIG. 5. Correlation between cardiac lactate concentration and pAMPK/AMPK ratio (A) and UCP-2 expression (B) in mice treated with HF diet for 8 wk.

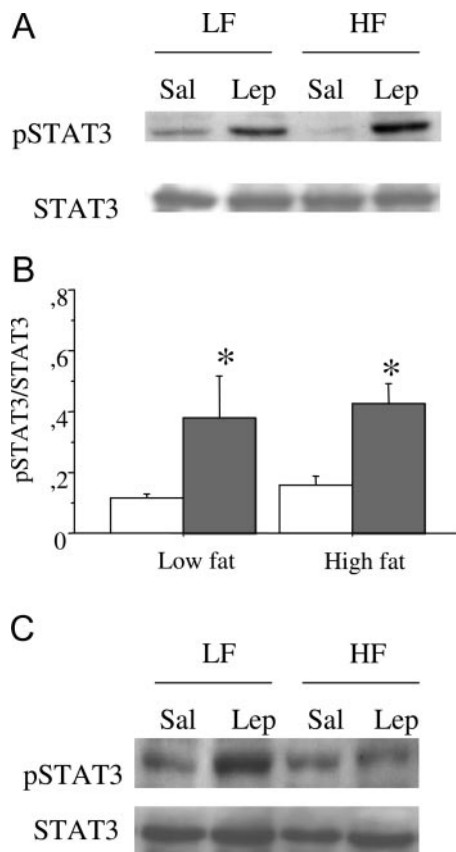


FIG. 6. Cardiac expression of STAT3 and pSTAT3 90 min after leptin injection (1 mg/kg ip) to mice treated during 8 wk with HF diet. A, Immunoblot of both STAT3 and pSTAT3 obtained from left ventricle. B, Effect of leptin on STAT3 phosphorylation as the mean \pm SEM of the ratio pSTAT3/STAT3 ($n = 5-7$ animals). *, $P < 0.05$ compared with the control group. C, Effect of acute leptin (1 mg/kg ip) on STAT3 phosphorylation in the hypothalamus of both LF and HF mice.

autonomic nervous system, modulating metabolism in the heart.

Taken together, our data strongly suggest that during early states of DIO, there is a metabolic adaptation in the heart shifting from pyruvate to FA oxidation. The absence of cardiac leptin resistance, together with the positive correlation between plasma leptin and UCP-2 expression, suggest that this shift is mediated, at least in part, by leptin. The increase in plasma leptin occurring in parallel with the increase in adipose tissue has the physiological significance of protecting nonadipose tissue and, in our context, the heart, against ectopic lipidic deposition and lipotoxicity. Indeed, it has been reported that leptin deficiency in ob/ob mice is accompanied by the accumulation of TGs in cardiac myocytes (15) and that leptin reverses morphological alterations in the ob/ob mouse (14). However, the participation of other adipokines, such as adiponectin (Ref. 1 and references cited therein), cannot be excluded.

In summary, we demonstrate that, with diets containing elevated fat, the heart cannot initially metabolize the excess dietary lipids and, instead, stores them as TGs. However, a subsequent surge in plasma leptin concentration, linked to an increased adiposity, induces the expression of UCP-2 and

phosphorylates AMPK, leading to a normalization of cardiac TG content together with a shift to FA as an energy source. Our work shows that all these changes could be advantageous because they contribute to impairing ectopic fat deposition in the heart and suggest that further resistance to leptin might be responsible for cardiac lipotoxicity.

Acknowledgments

We acknowledge J.M. Garrido, J. Bravo, and I. Bordallo for skillful animal care during the experiment.

Received July 10, 2006. Accepted October 25, 2006.

Address all correspondence and requests for reprints to: Mariano Ruiz-Gayo, Departamento de Farmacología, Tecnología y Desarrollo Farmacéutico, Facultad de Farmacia, Universidad San Pablo-Ceu, Urbanización Montepríncipe, Carretera de Boadilla del Monte km 5,3 Boadilla del Monte, 28668 Madrid, Spain. E-mail: ruigayo@ceu.es.

This work was supported by the Ministerio de Educación y Ciencia (Grants SAF 2003-01603, BFI 2003-03455, SAF 2005-05180, and SAF 2006-02456) and by the Fundación San Pablo-Ceu.

The authors have nothing to disclose.

References

- Unger RH 2003 Minireview: weapons of lean body mass destruction: the role of ectopic lipids in the metabolic syndrome. *Endocrinology* 144:5159–5165
- Zhou Y-T, Shimabukuro M, Koyama K, Lee Y, Wang M-Y, Trieu F, Newgard CB, Unger RH 1997 Induction by leptin of uncoupling protein-2 and enzymes of fatty acid oxidation. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:6386–6390
- Shimabukuro M, Koyama K, Chen G, Wang M-Y, Trieu F, Lee Y, Newgard CB, Unger RH 1997 Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:4637–4641
- Wang M-Y, Shimabukuro M, Lee Y, Trinh KY, Chen JL, Newgard CB, Unger RH 1999 Adenovirus-mediated overexpression of uncoupling protein-2 in pancreatic islets of Zucker diabetic rats increases oxidative activity and improves β -cell function. *Diabetes* 48:1020–1025
- Unger RH, Zhou Y-T, Orci L 1999 regulation of fatty acid homeostasis in cells: Novel role of leptin. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:2327–2332
- Lee Y, Naseem H, Duplomb L, Park B-H, Garry DJ, Richardson JA, Schaffer JE, Unger RH 2004 Hyperleptinemia prevents lipotoxic cardiomyopathy in acyl CoA synthase transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:13624–13629
- Unger RH 2005 Hyperleptinemia: protecting the heart from lipid overload. *Hypertension* 45:1031–1034
- van Heek M, Compton DS, France CF, Tedesco RP, Fawzi AB, Graziano MP, Sybertz EJ, Strader CD, Davis HR 1997 Diet-induced obese mice develop peripheral, but not central, resistance to leptin. *J Clin Invest* 99:385–390
- Scarpace PJ, Matheny M 1998 Leptin induction of UCP1 gene expression is dependent on sympathetic innervation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 275: E259–E264
- Chen G, Koyama K, Yuan X, Lee Y, Zhou Y-T, O'Doherty, CB, Newgard, Unger R 1996 Disappearance of body fat in normal rats induced by adenovirus-mediated leptin gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:14795–14799
- El-Haschimi K, Pierroz DD, Hileman SM, Bjorbaek C, Flier J 2000 Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. *J Clin Invest* 105:1827–1832
- Münzberg H, Flier JS, Bjorbaek C 2004 Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice. *Endocrinology* 145: 4880–4889
- Sowers JR 2003 Obesity as a cardiovascular risk factor. *Am J Med* 115:375–415
- Brouch LA, Berkowitz DE, Harrison RW, O'Donnell CP, Hare JM 2003 Disruption of leptin signaling contributes to cardiac hypertrophy independently of body weight in mice. *Circulation* 108:754–759
- Christoffersen C, Bollano E, Lindegaars MLS, Bartels ED, Gotéese JP, Andersen CB, Nielsen L 2003 Cardiac lipid accumulation associated with diastolic dysfunction in obese mice. *Endocrinology* 144:3483–3490
- Mazumder PK, O'Neill BT, Roberts MW, Buchanan J, Yun UJ, Cooksey RC, Boudina S, Abel ED 2004 Impaired cardiac efficiency and increased fatty acid oxidation in insulin-resistant ob/ob mouse hearts. *Diabetes* 53:2366–2374
- Boss O, Hagen T, Lowell B 2000 Uncoupling proteins 2 and 3. Potential regulators of mitochondrial energy metabolism. *Diabetes* 49:143–156
- Lopaschuk GD, Collins-Nakai RL, Itoi T 1992 Developmental changes in energy substrate use by the heart. *Cardiovasc Res* 26:1172–1180
- Gertz EW, Wisneski JA, Stanley WC, Neese RA 1998 Myocardial substrate utilization during exercise in humans: dual carbon-labelled carbohydrate isotope experiments. *J Clin Invest* 82:2017–2025

20. **Stanley WC, Chandler MP** 2002 Energy metabolism in the normal and failing heart: potential for therapeutic interventions. *Heart Fail Rev* 7:115–130
21. **Martin TL, Alquier T, Asakura K, Furukawa N, Preitner F, Kahn BB** 2006 Diet-induced obesity alters AMP-kinase activity in hypothalamus and skeletal muscle. *J Biol Chem* 281:18933–18941
22. **Bachmann E, Weber E** 1990 Effects of corn oil addition to the diet on the energy metabolism of heart, liver and kidney of female rats. *Pharmacol Toxicol* 67:49–55
23. **Sivitz WI, Fink BD, Donohoue PA** 1999 Fasting and leptin modulate adipose and muscle uncoupling protein: divergent effects between messenger ribonucleic acid and protein expression. *Endocrinology* 140:1511–1519
24. **Zhou Y-T, Wang Z-W, Higa M, Newgard CB, Unger RH** 1999 Reversing adipocyte differentiation: implications for treatment of obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:2391–2395
25. **Gimeno RE, Dembski M, Weng X, Deng N, Shyjan AW, Gimeno CJ, Iris F, Ellis SJ, Woolf EA, Tartaglia LA** 1997 Cloning and characterization of an uncoupling protein homolog. A potential molecular mediator of human thermogenesis. *Diabetes* 46:900–906
26. **Commins AP, Watson PM, Padgett MA, Dudley A, Argyropoulos G, Gettys TW** 1999 Induction of uncoupling protein expression in brown and white adipose tissue by leptin. *Endocrinology* 140:292–300
27. **Lollmann B, Gruninger S, Stricker-Krongrad A, Chiesi M** 1997 Detection and quantification of the leptin receptor splice variants Ob-Ra, b, and e in different mouse tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 238:648–652
28. **Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Woolf EA, Monroe CA, Tepper R** 1995 Identification and expression cloning of a leptin receptor, Ob-R. *Cell* 83:1263–1271

Endocrinology is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.

Sensitivity of Cardiac Carnitine Palmitoyltransferase to Malonyl-CoA Is Regulated by Leptin: Similarities with a Model of Endogenous Hyperleptinemia

Rocío Guzmán-Ruiz, Beatriz Somoza, Marta Gil-Ortega, Beatriz Merino, Victoria Cano, Camille Attané, Isabelle Castan-Laurell, Philippe Valet, María S. Fernández-Alfonso, and Mariano Ruiz-Gayo

Departamento de Ciencias Farmacéuticas y de la Alimentación (R.G.-R., B.S., M.G.-O., B.M., V.C., M.R.-G.), Facultad de Farmacia, Universidad Ceu-San Pablo, 28668 Madrid, Spain; Institut de Médecine Moléculaire de Rangueil (C.A., I.C.-L., P.V.), I2MR Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 858, Université Paul Sabatier, 31432 Toulouse, France; and Instituto Pluridisciplinar and Departamento de Farmacología (M.S.F.-A.), Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

Acute leptin increase as well as endogenous hyperleptinemia evoked by high-fat diets (HF) activate fatty acid metabolism in nonadipose tissues. This supports the notion that hyperleptinemia is pivotal to prevent/delay steatosis during periods of positive energy balance. We have previously shown that long-term HF spares ectopic accumulation of lipids specifically in the myocardium. Because carnitine palmitoyltransferase I (CPT-I) allows mitochondrial uptake/oxidation of fatty acids, we have hypothesized that leptin drives cardiac CPT-I activity. In the current study, hyperleptinemia was induced in C57BL/6J mice either by exogenous leptin administration or by means of HF, and the ability of malonyl-coenzyme A (malonyl-CoA) (the main endogenous inhibitor of CPT-I) to inhibit cardiac CPT was analyzed. IC_{50} values of malonyl-CoA were $8.1 \pm 1.5 \mu\text{mol/liter}$ in controls vs. $69.3 \pm 5.2 \mu\text{mol/liter}$ ($P < 0.01$) in leptin-treated mice. This effect was also observed in cardiac explants incubated with leptin and was blocked by triciribine, a compound shown to inhibit protein kinase B (Akt) phosphorylation (pAkt). In accordance, acute leptin evoked an increase of cardiac pAkt levels, which correlated with CPT sensitivity to malonyl-CoA. Otherwise, the inhibitory effect of malonyl-CoA was hindered in HF hyperleptinemic mice, and in this case, pAkt levels also correlated with CPT sensitivity to malonyl-CoA. Our data show that leptin reduces the sensitivity of cardiac CPT-I to malonyl-CoA and suggest the involvement of an Akt-related signaling pathway in this effect. This mechanism appears to be sensitive to both acute and chronic hyperleptinemia. We conclude that this action of leptin is pivotal to drive cardiac metabolism under situations associated to hyperleptinemia. (*Endocrinology* 151: 1010–1018, 2010)

Cardiac energetic needs are met by mitochondrial oxidation of fatty acids (FA) and, in minor extent, of pyruvate. The relative contribution of each fuel is driven by FA availability and is linked to the type of diet, physical activity, or pathophysiological conditions such as diabetes, hypertrophy, or chronic ischemia. Control of FA oxidation largely depends on mitochondrial uptake of FA by the carnitine palmitoyltransferase (CPT) system, which

includes the sequential action of CPT-I and CPT-II. The transfer of FA moiety from acyl-coenzyme A (acyl-CoA) to carnitine is carried out by CPT-I. CPT-II accounts for the transport of acylcarnitine derivatives into the mitochondria and subsequent transference of acyl residues to CoA, yielding intramitochondrial acyl-CoA (1–4).

CPT-I activity is competitively inhibited by malonyl-CoA and is affected by alterations of the nutritional status,

ISSN Print 0013-7227 ISSN Online 1945-7170
Printed in U.S.A.

Copyright © 2010 by The Endocrine Society

doi: 10.1210/en.2009-1170 Received September 29, 2009. Accepted December 10, 2009.

First Published Online January 7, 2010

Abbreviations: ACC, Acetyl-CoA carboxylase; acyl-CoA, acyl-coenzyme A; Akt, protein kinase B; AMPK, AMP-activated protein kinase; CPT, carnitine palmitoyltransferase; DIO, diet-induced obesity; FA, fatty acids; HF, high fat; LF, low fat; pAkt, phosphorylated Akt; pAMPK, phosphorylated AMPK; pSTAT3, phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3; TCB, triciribine.

such as starvation or changes of diet composition (5–7). Synthesis of malonyl-CoA is regulated by the AMP-activated protein kinase (AMPK)/acetyl-CoA carboxylase (ACC) pathway, depending on energetic needs (8). Regulation of cardiac FA oxidation by AMPK occurs through phosphorylation and inhibition of ACC. Thus, when ATP supply decreases, AMPK is phosphorylated, ACC is inhibited, malonyl-CoA levels fall, and β -oxidation is activated. Under these conditions, pyruvate oxidation is inhibited (9) and FA become almost the unique source of oxidative ATP production (10). In contrast, when energetic needs are fulfilled, dephosphorylation of AMPK leads to the activation of ACC, which stimulates malonyl-CoA synthesis and drives long chain acyl-CoA toward complex lipid synthesis. If this situation lasts for a long period, ectopic deposition of lipids and cardiac lipotoxicity can occur (11–13). Cardiac AMPK is also negatively regulated by proteinkinase B (Akt) (14).

The influence of diet composition on cardiac metabolism depends on the partial contribution of fat/carbohydrates to the daily caloric intake. In the heart, short-term treatment with high-fat (HF) diets (8 wk) has been shown to evoke the adaptation of energetic metabolism, characterized by increased phosphorylation of AMPK and mitochondrial uncoupling. This adaptation aims at preventing ectopic lipid deposition, and it has been proposed that leptin would play a pivotal role in this cardiac metabolic remodelling (15). We have also reported that long-term treatment (32 wk) with a HF diet, which leads to severe obesity and marked hyperinsulinemia/hyperleptinemia, spares triglyceride accumulation in the heart. Although under these conditions leptin resistance affects most of tissues/organs, cardiac leptin receptors keep full responsiveness, suggesting that leptin plays a role in preventing lipid accumulation (16). Our hypothesis is that leptin might drive FA metabolism in cardiac tissue by modulating CPT-I activity. Therefore, the current study has been designed to characterize the effect of hyperleptinemia on CPT activity. With this purpose, C57BL/6J were made hyperleptinemic either by administration of exogenous leptin or by a dietary treatment with HF chow, and we analyzed the ability of malonyl-CoA to inhibit CPT under these conditions. Our goal was to provide insights on mechanisms involved in preventing/delaying cardiac steatosis under pathophysiological conditions triggered by long-term overload with dietary fat.

Materials and Methods

Experimental design

In this study, we have characterized the effect of 1) diet-induced obesity (DIO)/hyperleptinemia, and 2) leptin on the sen-

sitivity of cardiac CPT to malonyl-CoA. Four-week-old male C57BL/6J mice (Harlan, Barcelona, Spain) were housed (five per cage) under a 12-h light, 12-h dark cycle in a temperature-controlled room (22 C) with food and water *ad libitum*. The investigation conforms to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). Animals were divided into two groups with similar average body weight, housed five per cage, and assigned either to a low-fat (LF) or to a HF diet. LF (D12450B, 10 kcal % fat, 70 kcal % carbohydrates and 20 kcal % protein; 3.85 kcal/g) or HF (D12451, 45 kcal % fat, 35 kcal % carbohydrates and 20 kcal % protein; 4.73 kcal/g) diets were supplied by Research Diets, Inc. (New Brunswick, NJ) and will be referred to as LF and HF, respectively. After 32-wk dietary treatment, groups of animals were treated (ip) either with saline or 1 mg/kg mouse leptin (Sigma, St. Louis, MO) at 0900 h. Ninety minutes later, animals were decapitated, blood collected in chilled EDTA-coated polypropylene tubes, and left ventricle dissected. Animals had always free access to food and tap water. Plasma samples were stored at -80 C until assay, and tissues were prepared for CPT activity quantification. Some hearts from LF mice were used to measure CPT activity in left ventricle explants. Dosage of leptin was chosen in basis to previous studies of our group (15).

Plasma measurements

Plasma leptin concentration was analyzed by using a specific RIA kit for murine leptin (Linco Research, Inc., St. Charles, MO) (4.9% intraassay variation, 3.3% interassay variation). Insulin was determined by means of a specific enzyme immunoassay kit for mouse insulin (Merckodia, Denmark) (2.2% intraassay variation, 4.9% interassay variation).

Measurement of cardiac triglycerides

Triglyceride content in heart was determined as previously described (15). Briefly, 20 mg of wet tissue were homogenized in a solvent mixture containing 40 μ l of 2 mM NaCl/20 mM EDTA/50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4), 40 μ l of tert-butanol, and 20 μ l of Triton X-100/methanol mixture (1/1). Triglycerides were measured with a Sigma diagnostic kit.

Preparation of left ventricle explants

Left ventricles were sliced (250 μ m thick) with a tissue chopper. Each slice was incubated in 1 ml oxygenated (95% O₂-5% CO₂) Krebs-Henseleit solution containing 10 μ g/ml leptin. After 1-h incubation at 37 C, slices were processed for CPT assay, as described below.

CPT assay

Total CPT activity was measured in isolated mitochondria by means of a colorimetric method (17, 18). Briefly, tissues (10% wt/vol) were homogenized, at 4 C, in 20 mM HEPES (pH 7.4) containing 140 mM KCl, 10 mM EDTA, and 5 mM MgCl₂. The homogenate was centrifuged at 500 \times g (10 min, 4 C) and the supernatant recentrifuged at 9000 \times g (35 min, 4 C). The pellet was collected and resuspended in 150 μ l buffer. Isolated mitochondria (0.1 mg protein/ml) were assayed in 100 μ l assay buffer containing 20 mM HEPES (pH 7.4), 1 mM EGTA, 220 mM sucrose, 40 mM KCl, 0.1 mM 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic) acid (Sigma), 1.3 mg/ml BSA, and 40 μ M palmitoyl-CoA (Sigma) at 25 C. The reaction was started by adding 1 mM carnitine and mon-

itored at 412 nm (VERSAmix Microplate Reader; Molecular Devices, Sunnyvale, CA) after 10-min incubation at 25 C. Inhibition assays with malonyl-CoA (0–100 $\mu\text{mol/liter}$) were performed under identical experimental conditions but malonyl-CoA was added just before carnitine. CPT activity in absence/presence of malonyl-CoA will be further referred as total CPT and malonyl-CoA-insensitive CPT activities, respectively. Results are expressed as Δ Abs/min/mg protein.

Western blot analysis for the phosphorylated forms of AMPK (pAMPK), signal transducer and activator of transcription 3 (pSTAT3), and Akt (pAkt)

pAMPK, pSTAT3, and pAkt were measured in whole cardiac left ventricle. Briefly, tissues were homogenized in ice-cold buffer containing 0.42 M NaCl, 20 mM HEPES (pH 7.9), 1 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, 20% glycerol, 1 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin, 1 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin, 20 mM sodium fluoride, 1 mM trisodium orthovanadate, and 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride. Tubes containing homogenates were frozen at -80 C and thawed at 37 C three consecutive times, then centrifuged for 10 min at 4 C. Equivalent amounts of proteins (50 μg) present in the supernatant were loaded in Laemli buffer [50 mM Tris (pH 6.8), 10% sodium dodecyl sulfate, 10% glycerol, 5% mercaptoethanol, and 2 mg/ml blue bromophenol] and size-separated in 15% SDS-PAGE. Proteins were transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Amersham Pharmacia, Barcelona, Spain) using a transblot apparatus (Bio-Rad, Madrid, Spain). For immunoblotting, membranes were blocked with 5% nonfat dried milk in Tween-PBS for 1 h. Primary antibodies against pAMPK- α (Thr¹⁷²) (1:1000 final dilution; Cell Signaling Technology, Beverly, MA), AMPK- α (1:1000 final dilution; Cell Signaling Technology), pSTAT3 (Tyr⁷⁰⁵) (1:1000 final dilution; Cell Signaling Technology), STAT3 (1:1000 final dilution; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), pAkt (Ser⁴⁷³) (1:100 final dilution; Cell Signaling Technology), and AKT (1:100 final dilution; Cell Signaling Technology) were applied at the convenient dilution overnight at 4 C. After washing, appropriate secondary antibodies (antirabbit IgG-peroxidase conjugated) were applied for 1 h at a dilution of 1:5000. Blots were washed, incubated in commercial enhanced chemiluminescence reagents (Amersham Pharmacia) and exposed to autoradiographic film. Films were scanned by using a GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad), and blots were quantified using Quantity One software (Bio-Rad). Values for pAMPK, pSTAT3, and pAkt were normalized with AMPK, STAT3, and Akt, respectively.

Triciribine (TCB) treatment protocol

TCB (BioMol, Plymouth Meeting, PA) was administered by i.p. as described by Shein *et al.* (19). Briefly, TCB was dissolved in 2% dimethylsulfoxide/saline at a final concentration of 0.1 mg/ml. TCB or vehicle (2% dimethylsulfoxide in saline) administration was conducted at 0900 h at 1 mg/kg. Thirty minutes later, leptin (1 mg/kg) or saline were administered by ip, animals were killed at 1100 h, and cardiac mitochondria immediately prepared for CPT activity assay. Malonyl-CoA was tested at 50 $\mu\text{mol/liter}$.

Statistics

Variations of CPT activity in response to leptin and malonyl-CoA were analyzed by a two-way ANOVA. Other parameters

TABLE 1. Effect of HF diet on body weight, heart weight, cardiac triglycerides (TG), and plasma parameters

| | LF diet | HF diet |
|--|-----------------|------------------------------|
| Body weight (g) | 34.5 \pm 0.5 | 48.8 \pm 1.1 ^a |
| Heart weight (mg) | 162.5 \pm 2.8 | 171.3 \pm 2.4 ^b |
| Cardiac TG (mg/g tissue) | 39.4 \pm 5.1 | 27.9 \pm 2.7 |
| Plasma leptin (ng/ml) | 13.6 \pm 1.7 | 28.4 \pm 5.9 ^b |
| Plasma insulin ($\mu\text{g/liter}$) | 2.10 \pm 0.31 | 5.81 \pm 0.59 ^a |

^a $P < 0.001$; ^b $P < 0.05$ compared vs. LF group (Newman Keuls' test).

were analyzed by a one-way ANOVA, followed by Newman-Keuls' *post hoc* test. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

Results

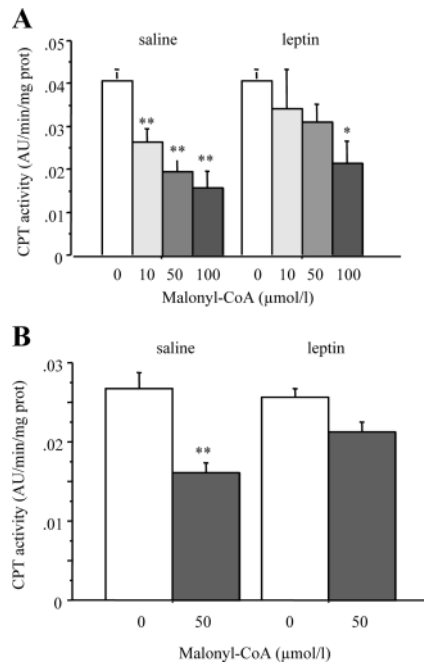
Effect of dietary treatment on cardiac triglycerides and plasma parameters

Table 1 summarizes the effect of dietary treatment on body and heart weight, cardiac triglyceride content, and biochemical plasma parameters. Animals exposed to HF diet exhibited significant overweight ($F_{(1,32)} = 94.398$; $P < 0.001$), as well as elevated leptin ($F_{(1,15)} = 6.319$; $P < 0.05$) and insulin plasma concentration ($F_{(1,16)} = 30.368$; $P < 0.001$). We also detected a slight increase of heart weight ($F_{(1,30)} = 5.24$; $P < 0.05$), although cardiac triglyceride content was not affected by the type of diet.

Leptin reduces the inhibitory effect of malonyl-CoA on cardiac CPT activity both *in vivo* and *in vitro*

We first determined the ability of malonyl-CoA to inhibit cardiac CPT in isolated mitochondria of mice treated with exogenous leptin. Figure 1A illustrates the effect of leptin administration (1 mg/kg) on cardiac CPT inhibition by malonyl-CoA (10–100 $\mu\text{mol/liter}$). Two-way ANOVA revealed that the effect of malonyl-CoA ($F_{(1,44)} = 18,420$; $P < 0.001$) was dependent on leptin treatment ($F_{(1,44)} = 2,712$; $P < 0.05$, for the interaction between malonyl-CoA and leptin). IC_{50} values of malonyl-CoA were 8.1 ± 1.5 $\mu\text{mol/liter}$ in control animals *vs.* 69.3 ± 5.2 100 $\mu\text{mol/liter}$ ($P < 0.01$) in leptin-treated mice. Plasma leptin concentrations were 13.6 ± 1.7 ng/ml in control animals *vs.* 81.1 ± 12.8 ng/ml ($P < 0.01$) in animals treated with exogenous leptin.

The effect of leptin on CPT activity was also tested in left ventricle explants incubated with murine leptin (Fig. 1B). We observed that 50 $\mu\text{mol/liter}$ malonyl-CoA inhibited CPT activity (2-way ANOVA, $F_{(1,22)} = 25,658$; $P < 0.001$), and this effect was abolished when explants were previously incubated with 10 $\mu\text{g/ml}$ leptin ($F_{(1,22)} = 4,290$; $P < 0.05$ for the interaction between malonyl-CoA and



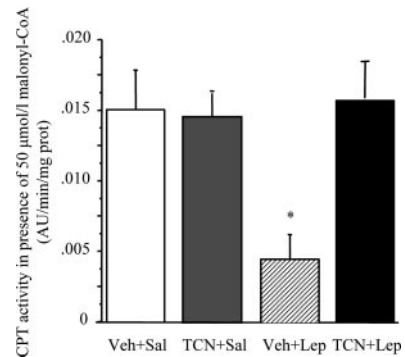
treatment with leptin). Further statistical analysis indicated that malonyl-CoA only inhibited CPT activity in controls (one-way ANOVA, $F_{(1,11)} = 18,984; P < 0.01$), but not in samples incubated with leptin.

TCB, an inhibitor of Akt phosphorylation, antagonizes the effect of leptin in reducing CPT sensitivity to malonyl-CoA

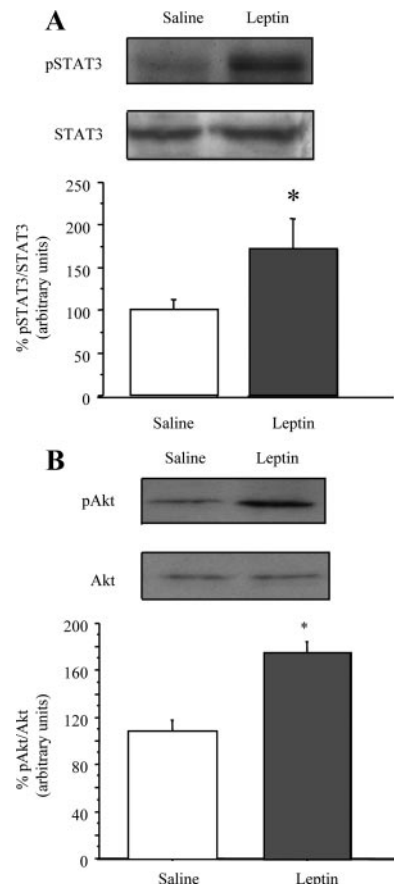
Activity of cardiac CPT was determined in mice receiving 1 mg/kg TCB previous to leptin administration. As illustrated in Fig. 2, the ability of 50 μmol/liter malonyl-CoA to inhibit CPT activity was reduced by 65% in leptin-treated mice (1 mg/kg) and the effect of leptin was fully blocked by TCB (*P* < 0.05).

Leptin enhances Akt and STAT3 phosphorylation in the heart

Because phosphorylation of STAT3 and/or Akt is indicative of activation of signaling pathways coupled to leptin receptors, we measured the effect of 1 mg/kg leptin on both pSTAT3 and pAkt concentration in cardiac tissue.



As illustrated in Fig. 3, pSTAT3 ($F_{(1,17)} = 6,681; P < 0.05$) as well as pAkt ($F_{(1,15)} = 5,297; P < 0.05$) appeared to be increased in leptin-treated mice.



Plasma leptin concentration positively correlates with pAkt as well as with malonyl-CoA-insensitive CPT activity

Although it is widely assumed that elevated concentrations of malonyl-CoA inhibit CPT-I and preserve CPT-II activity, sensitivity of CPT-I to malonyl-CoA is modulated by several factors. We have reconsidered the idea that CPT activity in presence of malonyl-CoA reflects only CPT-II activity, as previously suggested by Kim *et al.* (5). In this paper, we refer to total CPT activity (measured in absence of malonyl-CoA) and malonyl-CoA insensitive CPT activity (determined in presence of malonyl-CoA).

Figure 4 shows the correlations between plasma leptin concentration and pAkt (Fig. 4A) or malonyl-CoA insen-

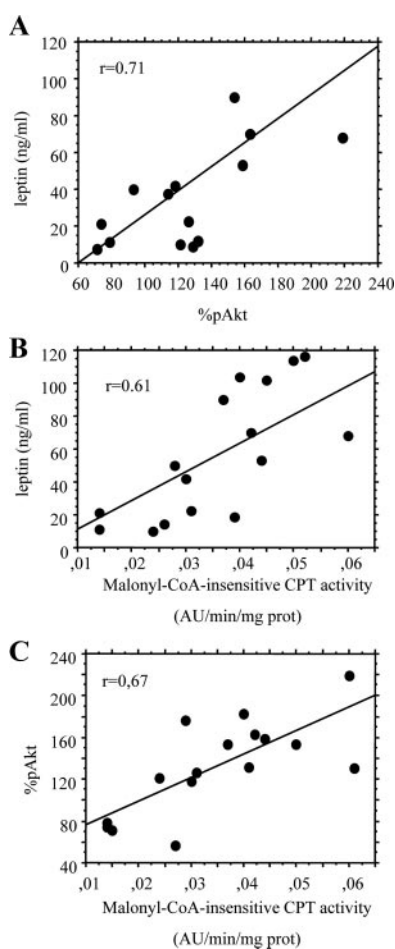


FIG. 4. A, Correlation between plasma leptin concentration and pAkt in hearts from normal mice receiving 1 mg/kg leptin (ip) or vehicle. Simple regression analysis evidences a positive correlation between leptin and pAkt, which suggest that leptin activates signaling pathways in the heart leading to an increase of pAkt. B, Correlation between plasma leptin and CPT activity in presence of 50 $\mu\text{mol/liter}$ malonyl-CoA (malonyl-CoA-insensitive CPT activity) determined in cardiac mitochondria from mice receiving 1 mg/kg leptin (ip) or vehicle. This correlation reveals that the effect of malonyl-CoA appears to be hindered when plasma leptin levels are elevated. C, Correlation between pAkt and CPT activity in presence of malonyl-CoA. This correlation suggests that Akt phosphorylation is coincident with a decreased ability of malonyl-CoA to inhibit CPT.

sitive CPT activity (Fig. 4B). First, we observed that Akt phosphorylation increased proportionally to plasma leptin concentration ($F_{(1,16)} = 16,022$; $P < 0.01$; Fig. 4A). Because leptin reduces the ability of malonyl-CoA to inhibit CPT, we also analyzed, by simple regression analysis, the correlation between plasma leptin concentration and malonyl-CoA insensitive CPT activity. As illustrated in Fig 4B, plasma leptin concentration positively correlated with CPT activity ($F_{(1,16)} = 7,387$; $P < 0.05$) in samples exposed to 50 $\mu\text{mol/liter}$ malonyl-CoA. Simple regression analysis revealed that pAkt was also proportional to malonyl-CoA-insensitive CPT activity ($F_{(1,15)} = 16,348$; $P < 0.01$; Fig. 4C). All correlations correspond to individuals receiving either saline or 1 mg/kg leptin (ip).

Otherwise, plasma leptin concentration also correlated positively with pSTAT3 levels. Nevertheless, no correlation was detected between pSTAT3 and (data not shown).

Inhibition of cardiac CPT by malonyl-CoA is attenuated in mice receiving a HF diet

We tested the ability of 50 $\mu\text{mol/liter}$ malonyl-CoA to inhibit CPT activity in isolated mitochondria of both in normal and HF mice. As illustrated in Fig. 5A, two-way ANOVA revealed a significant effect of both dietary treat-

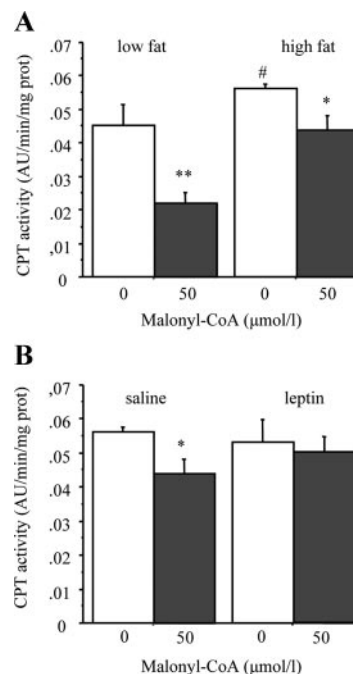


FIG. 5. A, Effect of malonyl-CoA on cardiac CPT activity in mice fed a HF diet during 32 wk. The 50 $\mu\text{mol/liter}$ malonyl-CoA decreased 55% total CPT activity in normal mice but only 21% in HF mice. Values are means \pm SEM of five to seven samples. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ compared with their respective control groups; #, $P < 0.05$ compared with the LF group in absence of 50 $\mu\text{mol/liter}$ malonyl-CoA (Newman-Keuls' test). B, Treatment with leptin fully prevents the inhibitory effect of malonyl-CoA on CPT activity in HF mice. Values are means \pm SEM of five to seven samples. *, $P < 0.05$ compared with their respective control group (Newman-Keuls' test).

ment ($F_{(1,18)} = 15,417$; $P < 0.001$) and malonyl-CoA ($F_{(1,18)} = 18,448$; $P < 0.001$). Malonyl-CoA inhibited CPT activity both in control (one-way ANOVA, $F_{(1,8)} = 10,699$; $P < 0.01$) and in HF mice (one-way ANOVA, $F_{(1,10)} = 6,757$; $P < 0.05$). Nevertheless, the inhibition detected in normal animals was significantly more pronounced than that detected in HF mice (one-way ANOVA, $F_{(1,9)} = 14,104$; $P < 0.01$). In the control group, malonyl-CoA decreased almost 55% of total CPT activity, which theoretically corresponds to the contribution of CPT-I to total CPT activity. In HF mice, inhibition was approximately 21%, which suggests a loss of sensitivity of CPT-I to inhibition by malonyl-CoA. This residual effect of malonyl-CoA was not observed in HF mice receiving 1 mg/kg leptin. In this case, two-way ANOVA revealed an effect of malonyl-CoA ($F_{(1,18)} = 8,543$; $P < 0.01$), which was significant in controls (one-way ANOVA, $F_{(1,10)} = 6,757$; $P < 0.05$) but not in leptin-treated mice. In this case, plasma leptin concentrations were 28.4 ± 5.9 ng/ml in control animals *vs.* 82.5 ± 11.8 ng/ml ($P < 0.01$) in animals treated with exogenous leptin (Fig. 5B).

pAkt is increased by HF diet

Dietary treatment with HF increased cardiac Akt phosphorylation, as appears illustrated in Fig. 6A ($F_{(1,18)} = 12,413$; $P < 0.01$). Levels of pAkt positively correlated with plasma leptin concentration ($F_{(1,9)} = 7,705$; $P < 0.05$; Fig. 6B) and also with malonyl-CoA insensitive CPT activity ($F_{(1,8)} = 8,571$; $P < 0.05$; Fig. 6C). Dietary treatment with HF reduced on basal levels of pAMPK ($F_{(1,17)} = 9,783$; $P < 0.01$), which were determined by Western blot analysis (Fig. 7A). Because phosphorylation of AMPK has been shown to be negatively regulated by pAkt, we also analyzed the correlation between pAkt and pAMPK. As illustrated in Fig. 7B, the concentration of pAkt negatively correlated with pAMPK levels ($F_{(1,18)} = 18,980$; $P < 0.001$).

Discussion

The major finding of the current study refers to the involvement of circulating leptin in regulating the sensitivity of cardiac CPT to its main endogenous inhibitor, malonyl-CoA (Fig. 1A). Moreover, this leptin effect seems to be linked to the activation of Akt, because we have observed that 1) leptin administration increases myocardial content of pAkt (Fig. 3B), and 2) inhibition of Akt by TCB antagonizes the effect of leptin in reducing the sensitivity of CPT to malonyl-CoA. The shift of malonyl-CoA IC_{50} observed in leptin-treated mice can theoretically reflect either a direct or an indirect effect of the hormone. In fact, a central

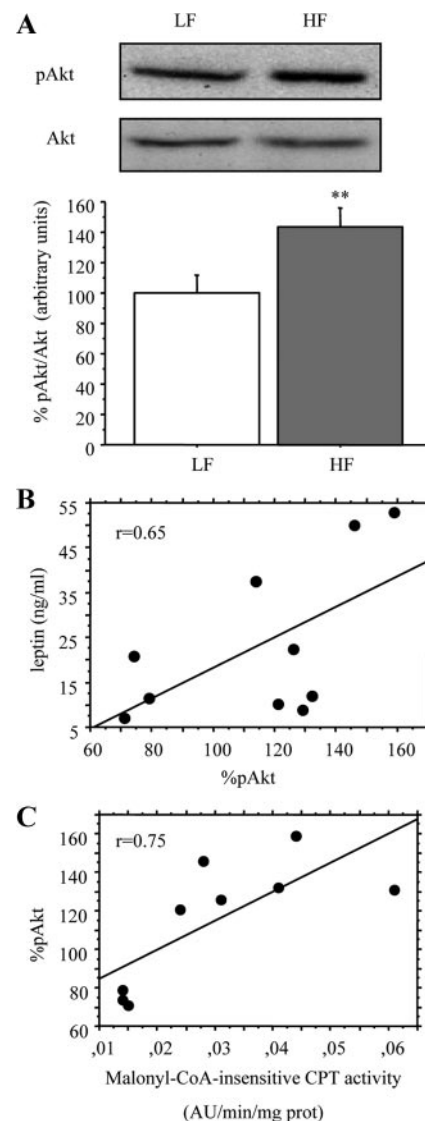


FIG. 6. A, Influence of dietary treatment on cardiac Akt phosphorylation. Both Akt and pAkt were measured by Western blot analysis in left ventricle. Diagram bars show the result of densitometric analysis of Akt immunoblots, expressed as percentage of pAkt in the control group. Values are means \pm SEM of eight to nine samples. **, $P < 0.01$ compared with controls (Newman-Keuls' test). B, Correlation between plasma leptin concentration and pAkt in mice undergoing a dietary treatment with a HF diet during 32 wk. Regression analysis shows a positive correlation between plasma leptin concentration and pAkt, as also observed in normal mice treated with exogenous leptin. C, Correlation between pAkt and CPT activity in presence of malonyl-CoA.

action of leptin might activate autonomous responses (20), leading to the stimulation of cardiac β -adrenergic receptors leading to Akt phosphorylation (21). Nevertheless, because leptin was also effective in heart explants (Fig. 1B), we suggest that, in spite of a hypothetical contribution of central mechanisms, the hormone acts directly on cardiac leptin receptors. Altogether these results point to a pivotal role of leptin in controlling FA catabolism in the heart.

Minokoshi *et al.* (22) have demonstrated that leptin facilitates β -oxidation by stimulating the AMPK/ACC

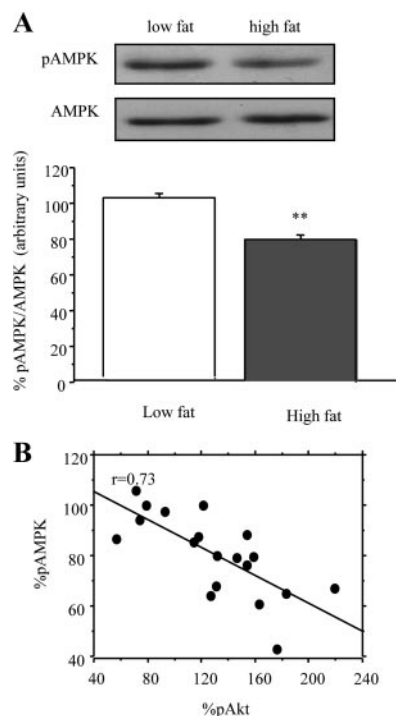


FIG. 7. Influence of dietary treatment on cardiac AMPK phosphorylation. **A**, Cardiac expression of AMPK and pAMPK measured by Western blot analysis. Diagram bars show the result of densitometric analysis of AMPK immunoblots, expressed as percentage of pAMPK in the control group. Values are means \pm SEM of eight to nine samples. **, $P < 0.01$ compared with low-fat group (Newman-Keuls' test). **B**, Negative correlation between pAMPK and pAkt.

pathway in skeletal muscle cells and by reducing malonyl-CoA synthesis. Our current data emphasize the existence of an alternative leptin-mediated pathway which would enhance β -oxidation by decreasing the sensitivity of CPT-I to malonyl-CoA. Concerning the underlying mechanism downstream of leptin receptors, a number of data point to the involvement of Akt. First, although both pAkt and pSTAT3 were increased by leptin in cardiac tissue, malonyl-CoA-insensitive CPT activity only correlated with pAkt levels (Fig. 4C). Second, plasma leptin concentrations in HF hyperleptinemic mice also correlated with pAkt levels which, in turn, were proportional to malonyl-CoA-insensitive CPT activity. Third, the effect of leptin on CPT kinetics was abolished by TCB, an inhibitor of Akt phosphorylation (23) which has been previously shown to inhibit Akt *in vivo* (19). Hence, a sequential activation of Akt and CPT might account for the effect of leptin. Our data strongly suggest that leptin-evoked phosphorylation of Akt is integral to mechanisms regulating β -oxidation and, in accordance with Atkinson *et al.* (24), point to the relevance of leptin in cardiac FA oxidation by an AMPK-independent mechanism. Although a detailed mechanism cannot be drawn from our data, we speculate that pAkt-evoked phosphorylation of CPT-I at Ser/Thr residues might regulate the affinity of malonyl-CoA for CPT-I. In

fact, Akt is a Ser/Thr kinase and CPT-1 has been shown to be a substrate of these enzymes (23–27).

A main question that emerges from our study concerns the physiological relevance of a leptin-dependent regulation of CPT-I. As plasma leptin values after administration of 1 mg/kg leptin largely exceed (~ 7 -fold) physiological concentrations of the hormone, even at the zenith of the circadian rhythm, we analyzed if regulation of CPT kinetics by leptin could be actually relevant under physiopathological situations characterized by hyperleptinemia. In accordance, we demonstrate that the sensitivity of cardiac CPT to malonyl-CoA appears to be impaired in mice made hyperleptinemic by means of a dietary treatment providing 45% cal from lard (Fig. 5A). In this study, it was also shown that the small inhibition of CPT activity elicited by malonyl-CoA in HF mice is sensitive to exogenous leptin (Fig. 5B). This supports the notion that cardiac tissue keeps leptin responsiveness even after long-lasting obesogenic dietary treatments (16) and also suggests that leptin might contribute to delay ectopic lipid deposition by regulating CPT-I even after insulin resistance sets up. In a recent paper, Wright *et al.* (28) have reported that myocardial FA utilization appears to be increased after HF feeding by a mechanism compatible with Akt activation. All this suggests that cross talk between leptin and insulin receptors in the heart might constitute a relevant mechanism to delay cardiac steatosis in obesity. At this point, it has to be noted that aleptinemic, and insulin-resistant, *ob/ob* mice exhibit cardiac steatosis, which is sensitive to leptin therapy (29).

The role of AMPK in regulating cardiac metabolism during health and disease has focused a large body of research (10, 30). In a previous study, we have demonstrated that the increase of AMPK phosphorylation is integral to the short-term remodelling of cardiac metabolism evoked by FA overload (15). Nevertheless, in the current work, we have detected a decrease of AMPK phosphorylation in DIO mice (Fig. 7A), together with an increase of pAkt (Fig. 6A). The negative correlation between pAkt and pAMPK (Fig. 7B) is in accordance with previous works demonstrating that cardiac Akt negatively regulates AMPK phosphorylation (14). This suggests that during long-term exposition to HF, pAkt and not pAMPK might drive FA metabolism.

Finally, the role of leptin in regulating CPT activity can be considered from two different perspectives. During periods of elevated caloric intake, which are initially linked to an increase of adiposity and leptinemia and later to obesity and insulin-resistance, leptin might drive FA oxidation and contribute to impair accumulation of lipids in nonadipose tissues (13) and to manage an eventual ATP deficit in insulin resistant hearts. On the other hand, the

effect of leptin might be detrimental in other situations, such as hypertrophic and/or postischemic heart. Under these conditions, high rates of FA oxidation, which inhibit pyruvate oxidation (31), would favor glycogen-related cardiomyopathy (10, 32).

In summary, this study shows that acute leptin reduces CPT-I sensitivity to malonyl-CoA in normal animals and suggests that hyperleptinemia might account for the impaired sensitivity of CPT-I to malonyl-CoA in obese mice through Akt. Our work provides insights to define cardiac metabolic remodeling during DIO, which are necessary to better understand clinical implications of obesity on cardiac disease (2, 33–37). Moreover, we suggest that leptin antagonists might be useful drugs to modulate cardiac metabolism of FA (38, 39).

Acknowledgments

We thank J. M. Garrido, I. Bordallo, and J. Bravo for skilful animal care.

Address all correspondence and requests for reprints to: Mariano Ruiz-Gayo, Departamento de Ciencias Farmacéuticas y de la Alimentación, Facultad de Farmacia, Universidad Ceu-San Pablo, Urbanización Montepríncipe, Boadilla del Monte, 28668 Madrid, Spain. E-mail: ruigayo@ceu.es.

This work was supported by Ministerio de Educación y Ciencia (SAF 2006-02456 and SAF 2005-0518), Fundación Universitaria San Pablo-Ceu, and Society for the Study of Cardiometabolic Health. R.G.-R. is a fellow from Ceu-Universidad San Pablo. B.M. and M.G.-O. are supported by grants from the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain.

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

References

- Lopaschuk GD, Belke DD, Gamble J, Itoi T, Schönekeß B 1994 Regulation of fatty acid oxidation in the mammalian heart in health and disease. *Biochem Biophys Acta* 1213:263–276
- Lopaschuk GD, Folmes CD, Stanley WC 2007 Cardiac energy metabolism in obesity. *Circ Res* 101:335–347
- Stanley WC, Chandler MP 2002 Energy metabolism in the normal and failing heart: potential for therapeutic interventions. *Heart Failure Rev* 7:115–130
- Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD 2005 Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev* 85:1093–1129
- Kim JY, Koves TR, Yu GS, Gulick T, Cortright RN, Dohm GL, Muoio DM 2002 Evidence of a malonyl-CoA-insensitive carnitine palmitoyltransferase I activity in red skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282:E1014–E1022
- Power GW, Newsholme EA 1997 Dietary fatty acids influence the activity and metabolic control of mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I in rat heart and skeletal muscle. *J Nutr* 127:2142–2150
- Weis BC, Essert V, Foster DW, McGarry JD 1994 Rat heart expresses two forms of mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I. *J Biol Chem* 269:18712–18715
- Folmes CD, Lopaschuk GD 2007 Role of malonyl-CoA in heart disease and the hypothalamic control of obesity. *Cardiovasc Res* 73:278–287
- Kerbey AL, Randle PJ, Cooper RH, Whitehouse S, Pask HT, Denton RM 1976 Regulation of pyruvate dehydrogenase in rat heart. *Biochem J* 154:327–348
- Dolinsky VW, Dyck JR 2006 Role of AMP-activated protein kinase in healthy and diseased hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291:H2557–H2569
- Atkinson LL, Kozak R, Kelly SE, Onay-Besikci A, Russel JC, Lopaschuk GD 2003 Potential mechanisms and consequences of cardiac triacylglycerol accumulation in insulin-resistant rats. *Am J Physiol Physiol Endocrinol Metab* 284:E923–E930
- McGavock JM, Victor RG, Unger RH, Szczepaniak LS 2006 Adiposity of the heart, revisited. *Ann Intern Med* 144:517–524
- Unger RH 2003 Minireview: weapons of lean body mass destruction: the role of ectopic lipids in the metabolic syndrome. *Endocrinology* 144:5159–5165
- Kovacic S, Soltys CL, Barr AJ, Shiojima I, Walsch K, Dyck JR 2003 Akt activity negatively regulates phosphorylation of AMP-activated protein kinase in the heart. *J Biol Chem* 278:39422–39427
- Somoza B, Guzmán R, Cano V, Merino B, Ramos P, Díez-Fernández C, Fernández-Alfonso MS, Ruiz-Gayo M 2007 Induction of cardiac uncoupling protein-2 expression and adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase phosphorylation during early states of diet-induced obesity. *Endocrinology* 148:924–931
- Guzmán-Ruiz R, Stucchi P, Gil-Ortega M, Merino B, Cano V, Somoza B, Fernández-Alfonso MS, Ruiz-Gayo M 2009 Adipogenic flux of triacylglycerol in diet-induced obesity is coincident with leptin signalling disruption of leptin within the liver (Abstract). *Obesity Facts* 2:149
- Boudina S, Sena S, O'Neill BT, Tathireddy P, Young ME, Abel ED 2005 Reduced mitochondrial oxidative capacity and increased mitochondrial uncoupling impair myocardial energetics in obesity. *Circulation* 112:2686–2695
- Rodnick KJ, Sidell BD 1994 Cold acclimation increases carnitine palmitoyltransferase I activity in oxidative muscle of striped bass. *Am J Physiol* 266:R405–R412
- Shein NA, Tsenter J, Alexandrovich AG, Horowitz M, Shohami E 2007 Akt phosphorylation is required for heat acclimation-induced neuroprotection. *J Neurochem* 103:1523–1529
- Elmquist JK, Ahima RS, Elias CF, Flier JS, Saper CB 1998 Leptin activates distinct projections from the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:741–746
- Morisco C, Condorelli G, Trimarco V, Bellis A, Marrone C, Condorelli G, Sadoshima J, Trimarco B 2005 Akt mediates the cross-talk between β -adrenergic and insulin receptors in neonatal cardiomyocytes. *Circ Res* 96:180–188
- Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Müller C, Carling D, Kahn BB 2002 Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* 415:339–343
- Yang L, Dan HC, Sun M, Liu Q, Sun XM, Feldman RI, Hamilton AD, Polokoff M, Nicosia SV, Herlyn M, Sebt SM, Cheng JQ 2004 Akt/protein kinase B signaling inhibitor-2, a selective small molecule inhibitor of Akt signaling with antitumor activity in cancer cells overexpressing Akt. *Cancer Res* 64:4394–4399
- Atkinson LL, Fischer MA, Lopaschuk GD 2002 Leptin activates cardiac fatty acid oxidation independent of changes in the AMP-activated protein kinase-acetyl-CoA carboxylase-malonyl-CoA axis. *J Biol Chem* 277:29424–29430
- Velasco G, Geelen MJ, Gómez del Pulgar T, Guzmán M 1998 Malonyl-CoA-independent acute control of hepatic carnitine palmitoyltransferase I activity. *J Biol Chem* 273:21497–21504
- Velasco G, Gómez del Pulgar T, Carling D, Guzmán M 1998 Evidence that the AMP-activated protein kinase stimulates rat liver carnitine palmitoyltransferase I by phosphorylating cytoskeletal components. *FEBS Lett* 439:317–320
- Kerner J, Distler AM, Minkler P, Parland W, Peterman SM, Hoppel

- CL 2004 Phosphorylation of rat liver mitochondrial carnitine palmitoyltransferase-I. *J Biol Chem* 279:41104–41113
28. Wright JJ, Kim J, Buchanan J, Boudina S, Sena S, Bakirtzi K, Ilkun O, Theobald HA, Cooksey RC, Kandror KV, Abel ED 2009 Mechanisms for increased myocardial fatty acid utilization following short-term high-fat diet. *Cardiovasc Res* 82:351–360
29. Lee Y, Wang MY, Kakuma T, Wang ZW, Babcock E, McCorkle K, Higa M, Zhou YT, Unger RH 2001 Liporegulation in diet-induced obesity. *J Biol Chem* 276:5629–5635
30. Arad M, Seidman CE, Seidman JG 2007 AMP-activated protein kinase in the heart: role during health and disease. *Circ Res* 100:474–488
31. Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA 1963 The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 13:785–789
32. Luptak I, Shen M, He H, Hirshman MF, Musi N, Goodyear LJ, Yan J, Wakimoto H, Morita H, Arad M, Seidman CE, Seidman JG, Ingwall JS, Balschi JA, Tian R 2007 Aberrant activation of AMP-activated protein kinase remodels metabolic network in favor of cardiac glycogen storage. *J Clin Invest* 117:1432–1439
33. Carroll R, Carley AN, Dyck JR, Severson DL 2005 Metabolic effects of insulin on cardiomyocytes from control and diabetic db/db mouse hearts. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288:E900–E906
34. Tschöp MH, Hui DY, Horvath TL 2007 Diet-induced leptin resistance: the heart of the matter. *Endocrinology* 148:921–923
35. Dyck JR, Cheng JF, Stanley WC, Barr R, Chandler MP, Brown S, Wallace D, Arrhenius T, Harmon C, Yang G, Nadzan AM, Lopaschuk GD 2004 Malonyl coenzyme A decarboxylase inhibition protects the ischemic heart by inhibiting fatty acid oxidation and stimulation glucose oxidation. *Circ Res* 94:e78–e84
36. Huss JM, Kelly DP 2005 Mitochondrial energy metabolism in heart failure: a question of balance. *J Clin Invest* 115:547–555
37. Selvetella G, Lembo G 2005 Mechanisms of cardiac hypertrophy. *Heart Failure Clin* 1:263–273
38. Dyck JR, Lopaschuk GD 2006 AMPK alterations in cardiac physiology and pathology: enemy or ally? *J Physiol* 574:95–112
39. Ussher JR, Lopaschuk GD 2008 The malonyl-CoA axis as a potential target for treating ischaemic heart disease. *Cardiovasc Res* 79:259–268