



**Universitat de les
Illes Balears**

**TESIS DOCTORAL
2014**

**ESTUDIO DE LAS CÉLULAS SANGUÍNEAS
COMO FUENTE DE MARCADORES
TRANSCRIPTÓMICOS DE UTILIDAD PARA LA
INVESTIGACIÓN DE LA OBESIDAD Y SUS
COMPLICACIONES**

Bàrbara Reynés Miralles



**Universitat de les
Illes Balears**

**TESIS DOCTORAL
2014**

Programa de doctorado de Nutrigenómica y Nutrición personalizada

**ESTUDIO DE LAS CÉLULAS SANGUÍNEAS COMO
FUENTE DE MARCADORES TRANSCRIPTÓMICOS DE
UTILIDAD PARA LA INVESTIGACIÓN DE LA
OBESIDAD Y SUS COMPLICACIONES**

Bàrbara Reynés Miralles

**Directora: Dra. Paula Oliver Vara
Director: Dr. Andreu Palou Oliver**

Doctora por la Universidad de las Islas Baleares

Los Directores de Tesis Doctoral

Dra. Paula Oliver Vara
Titular de Universidad
De Bioquímica y Biología Molecular

Dr. Andreu Palou Oliver
Catedrático de Universidad
De Bioquímica y Biología Molecular

La interesada

Sra. Bàrbara Reynés Miralles

Certificado de los directores de tesis y de la Mención Europea del doctorado



Dra. Paula Oliver Vara, Titular de Universidad de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de las Islas Baleares

y

Dr. Andreu Palou Oliver, Catedrático de Universidad de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de las Islas Baleares

DECLARAMOS:

Que la tesis doctoral que lleva por título *Estudio de las células sanguíneas como fuente de marcadores transcriptómicos de utilidad para la investigación de la obesidad y sus complicaciones*, presentada por Bàrbara Reynés Miralles para la obtención del título de doctor, ha sido dirigida bajo nuestra supervisión y que cumple con los requisitos necesarios para optar a la Mención Europea del título de doctor.

Y para que quede constancia de ello firmamos este documento.

Dra. Paula Oliver Vara
Titular de Universidad
De Bioquímica y Biología Molecular

Dr. Andreu Palou Oliver
Catedrático de Universidad
De Bioquímica y Biología Molecular

Palma de Mallorca, 9 de diciembre de 2014

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Gracias a todos los que formáis parte del Laboratorio de Biología Molecular, Nutrición y Biotecnología (LBNB) de la Universidad de las Islas Baleares, desde el primer momento me hicisteis sentir parte de este gran grupo.

En primer lugar, quiero agradecer esta tesis a mis directores: Dra. Paula Oliver y Prof. Andreu Palou, sin ellos esto no habría sido posible, sois para mí un gran ejemplo. De manera muy especial, gracias Andreu por dejarme formar parte de este grupo tan especial, por su gran ambiente de trabajo pero también por este lado tan humano que hace que trabajar aquí sea un gozo. Gracias por la supervisión y consejos que me has brindado, y por darme la oportunidad de realizar la estancia en la Universidad de Wageningen. Gracias Paula, por todo lo que me has enseñado, ayudado y animado. El camino de la tesis a tu lado ha sido fantástico, haciendo que las cosas buenas fuesen mucho mejores, siempre recordaré las primeras veces que entraba a tu despacho sabiendo que al salir todos los resultados tendrían un sentido, una explicación y se convertirían, muchas veces, en espectaculares. Gracias, por tu paciencia, por tu tiempo, gracias por convertir mi ilusión en una realidad; y también, y aún más importante, gracias por tus consejos. Para mí eres un ejemplo de superación, siempre lo consigues.

Gracias a los profesores del grupo: Dra. Francisca Serra, Dra. Catalina Picó, Dra. Ana Rodríguez, Dr. Joan Ribot y especialmente a la Dra. Luisa Bonet. Gracias Luisa por confiar en mí, por enseñarme y ofrecerme la posibilidad de trabajar en un proyecto de investigación, no puedo olvidar aquel día después de una clase de Máster donde me propusiste ayudar en dicho proyecto, ha sido un placer trabajar a tu lado. Gracias Enzo, por el trabajo que haces por nosotros y, sobretodo, gracias por tenernos siempre presentes y saber sacarnos siempre una sonrisa.

A los doctores Juana Sánchez, Teresa Priego, Josep Mercader, Mariona Palou y Núria Granados, gracias por estar siempre dispuestos a ayudar. También quiero agradecer al Dr. Josep Mercader y, principalmente, al Dr. Antoni Caimari por enseñarme y estar a mi lado cuando empecé en el laboratorio. Especialmente, gracias Mariona y Juana por vuestros consejos, ánimos, ayuda, por todo, no sé qué hubiese hecho sin vosotras.

Thanks to Prof. Jaap Keijer for allowing me to work in his group. Thanks to all the members of Jaap's group, especially to Dr. Evert van Schothorst and Inge van der Stelt for your advices and help on the microarray development and the data analysis.

Gracias a mis compañeros del laboratorio, especialmente, aquellos con los que he compartido mis años de tesis: Dra. Jadwiga, Juana María, Marina, Petar, Heriberto, Madhu, Raúl, Xisco, Estefanía, Rubén, Nora, Alice, Cati Dora, Alba, Marga, Andrea, Sebastià y Agustí. También quiero agradecer a todos los que han formado o forman parte del LBNB, a los doctores Jaume Amengual, Pilar Parra y María Servera, a Andreu Palou March y a los becarios Albert y Cristina. Gracias Estefanía y Rubén, mis compañeros de equipo, el camino ha llegado a su fin, ha sido un placer trabajar y compartir con vosotros largos días de estabulario, sacando sangre, poniendo en frío a los animales, haciendo el test de tolerancia oral a la glucosa, y ahora las publicaciones, fruto de este trabajo. Gracias Marga, ha sido un placer enseñarte todo lo que a mí me

enseñaron, aunque no hace mucho tiempo que trabajamos juntas formamos un buen equipo. Gracias por siempre estar dispuesta a ayudar, por tus detalles, trabajar con alguien como tú siempre es un placer. Marina, desde que empezamos a colaborar en los primeros años de carrera, éste ha sido nuestro sueño y compartirlo contigo ha sido genial. Gracias por cuidarme y por animarme. Que mejor que compartir todo el camino con una amiga, ¡ahora deseo que llegue tu día!

Gracias a los demás compañeros del laboratorio y la universidad. Bea, nuestra técnico, que siempre nos lo tiene todo a punto, y a Teresa, veterinaria del estabulario, por tus consejos con las ratas y ratones.

Gracias a mis amigas Jani, Marina, Ona y Joana, gracias por ayudarme y escucharme, por los cafetitos de las mañanas y las largas tardes trabajando que hemos compartido, pero, sobre todo, gracias por convertirnos en mis amigas. ¡Nada habría sido igual sin vosotras!

A mis amigos de la universidad, Marina, Marilena, Joana, Maria Antònia, Pep, Andreu, Jaume y Simó, gracias por todos los momentos que disfrutamos juntos.

A mis amigos de Lloseta, especialmente Paca, Marga, Malen, Xisca, Rafel, Tolo, Carles y Tomeu, y las demás amistades. Gracias por vuestra amistad, este gran regalo.

A ti Toni, por tener tanta paciencia, por confiar en mí, en que este proyecto llegaría a su fin, gracias por entenderme y apoyarme, por haber estado a mi lado, *t'estim*.

Finalmente quiero dar las gracias a mi familia. Especialmente a mis padres, Tomeu y Paquita, por quererme y darme siempre vuestro apoyo. Gracias a los dos, me habéis guiado, apoyado, animado, y enseñado que para que las cosas pasen hay que esforzarse, creer y querer, gracias por hacer de mí la persona que soy. Muchas gracias a mis hermanos Francesc y Tomeu, por ayudarme y alegrarme siempre. Gracias Francesc por tu apoyo, sabes que eres ejemplo para mí. También, gracias a Marisol y a Llorenç, por ser parte de mi familia. A mis abuelos Catalina y Paco, y a Bàrbara y Montserrat, mi abuelo Andreu y todos los que formáis parte de nuestra familia, por quererme, ayudarme y creer en mí. Esta tesis es para y por vosotros.

Simplemente, gracias.

Bàrbara

ÍNDICE

Abreviaturas	V
Resumen/Abstract	VII
Listado de artículos originales	XI
Capítulo I.- INTRODUCCIÓN	1
1.- Células sanguíneas como material biológico de interés en investigación para la obtención de biomarcadores	5
1.1.- Características y composición de la sangre	5
1.1.1.- Células sanguíneas	5
1.2.- Células mononucleares de sangre periférica (PBMC): características y aplicaciones	9
1.2.1.- PBMC en estudios clínicos	10
1.2.2.- PBMC en estudios de nutrición y obesidad	11
1.2.2.1.- PBMC y biomarcadores de efectos nutricionales	11
1.2.2.2.- PBMC y biomarcadores de obesidad	11
2.- Homeostasis energética y obesidad: papel de las PBMC	13
2.1.- Principales hormonas implicadas en el mantenimiento de la homeostasis energética	14
2.2.- El tejido adiposo y su función en la homeostasis energética	16
2.2.1.- El tejido adiposo y el metabolismo lipídico	18
2.2.1.1.- Lipólisis	18
2.2.1.2.- Lipogénesis y adipogénesis	19
2.2.2.- El tejido adiposo marrón (TAM) y la termogénesis adaptativa	20
2.2.2.1.- Activación del TAM como diana para el tratamiento de la obesidad	22
2.2.2.2.- Remodelación del tejido adiposo blanco a marrón: marronización o <i>browning</i>	22
2.2.2.3.- Dificultades en el estudio de la marronización	26
2.3.- El hígado y su función en la homeostasis energética	27
2.3.1.- El hígado y mantenimiento de la homeostasis de la glucosa	27
2.3.2.- El hígado y el metabolismo lipídico	27
2.3.2.1.- Lipólisis y oxidación de ácidos grasos	27
2.3.2.2.- Síntesis de ácidos grasos	28
2.4.- Adaptaciones metabólicas al ayuno y realimentación	29
2.5.- Alteraciones de la homeostasis energética en la obesidad	30
2.6.- Modelos animales para el estudio de la obesidad y la pérdida de peso	32
2.7.- PBMC como reflejo del metabolismo energético y la obesidad	33
Capítulo II.- OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL	35
Capítulo III.- MATERIAL Y MÉTODOS	43
1.- Animales de estudio	45
2.- Inducción de la obesidad mediante dietas ricas en grasa y su reversión	46
2.1.- Dieta de cafetería	46
2.2.- Dieta hiperlipídica comercial	46
3.- Extracción de sangre y aislamiento de PBMC	46
3.1.- Aislamiento de PBMC mediante Ficoll-Paque™ PLUS	47
3.2.- Aislamiento de PBMC mediante OptiPrep	47

4.- Aislamiento de ARN	48
4.1.- Aislamiento de ARN mediante Tripure o TRIzol	48
4.2.- Aislamiento de ARN mediante E.Z.N.A. Total RNA kit I	49
5.- Purificación y cuantificación de ARN	49
5.1.- Purificación mediante acetato de sodio	49
5.2.- Purificación mediante Quiagen RNeasy Mini Kit spin columns o MicroElute RNA Clean Up Kit	50
5.3.- Cuantificación y prueba de estado del ARN total	50
6.- Análisis de RT-PCR a tiempo real	51
6.1.- Retrotranscripción	51
6.1.1.- Retrotranscripción para muestras de TAB, TAM, hígado, hipotálamo y músculo	51
6.1.2.- Retrotranscripción para muestras de PBMC	52
6.2.- PCR tiempo real	52
7.- Cuantificación de lípidos hepáticos	53
8.- Determinación de glucosa circulante	54
9.- Test de tolerancia oral a la glucosa	54
10.- Determinación de insulina circulante	55
11.- Determinación del índice HOMA-IR	55
12.- Determinación de leptina circulante	55
13.- Determinación de ácidos grasos libres circulantes	56
14.- Determinación de triglicéridos circulantes	56
15.- Análisis histológico del hígado y TAB	56
16.- Análisis inmunohistoquímico de tejidos	57
17.- Análisis estadístico	57
Capítulo IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59
1.- Peripheral blood mononuclear cells: a potential source of homeostatic imbalance markers associated with obesity development	61
2.- Reversion to a control balanced diet is able to restore body weight and to recover altered metabolic parameters in adult rats long-term fed on a cafeteria diet	79
3.- Peripheral blood mononuclear cells as a potential source of biomarkers to test the efficacy of weight-loss strategies	103
4.- The intake of high fat diets induces an obesogenic profile in peripheral blood mononuclear cells	113
5.- The intake of high fat diets induces the acquisition of brown adipocyte gene expression features in the white adipose tissue depot and peripheral blood mononuclear cells	129
6.- PBMC can reflect physiological adaptations of adipose tissue to cold exposure	145
Capítulo V.- RECAPITULACIÓN	165
Capítulo VI.- CONCLUSIONES	171
Capítulo VII.- BIBLIOGRAFÍA	177

ABREVIATURAS

- ACC1:** Acetil coenzima A carboxilasa 1 (*Acetyl-coenzyme A carboxylase 1*)
- ACOX1:** Acil coenzima A oxidasa 1 (*Acyl-coenzyme A oxidase 1*)
- ACS:** Acil coenzima A sintasa (*Acyl-coenzyme A synthetase 1*)
- ADRB3:** Receptor adrenérgico beta-3 (*Beta-3 adrenergic receptor*)
- AGRP:** Péptido asociado a la proteína agoutí (*Agouti-related protein*)
- aP2:** Proteína de adipocitos 2 (*adipocyte Protein 2*)
- APOB48R:** Receptor de la apoproteína b 48 (*Apoprotein b 48 receptor*)
- ATGL:** Triglicérido lipasa adiposa (*Adipose triglyceride lipase*)
- ATP:** Trifosfato de adenosina (*Adenosine triphosphate*)
- BSS:** Solución salina equilibrada (*Balanced salt solution*)
- CART:** Tránsito relacionado con la cocaína y anfetamina (*Cocaine- and amphetamine-regulated transcript*)
- CEBPB:** Factor de transcripción Cebp β (*CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) β transcription factor*)
- CIDE-A:** Proteína inductora de la muerte celular DFFA-como efector A (*Cell death-inducing DFFA-like effector a*)
- CPT:** Carnitin palmitoil transferasa (*Carnitine Palmitoyl transferase*)
- DEPC:** Dietilenoipirocarbonato
- EBF3:** Factor 3 de las pre-células B (*Early B-cell factor 3*)
- EDTA:** Etildiaminotetracético
- EVA1:** Proteína Eva 1 (*Protein EVA 1*)
- FASN:** Sintasa de ácidos grasos (*Fatty acid synthase*)
- FBXO31:** Proteína F-BOX 31 (*F-box protein 31*)
- FGF21:** Factor de crecimiento de fibroblastos 21 (*Fibroblast growth factor 21*)
- HMG-CoA:** β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA
- HOMA-IR:** Modelo homeostático de evaluación de la resistencia a la insulina (*Homeostatic model assessment of insulin resistance*)
- HOXC9:** Homeobox C9
- HSL:** Lipasa sensible a hormonas (*Hormone-sensitive lipase*)
- IL:** Interleuquina (*Interleukin*)
- INF:** Interferón
- MSH- α :** Hormona estimuladora de los melanocitos- α (*Alpha-melanocyte stimulating hormone*)
- NEFA:** Ácidos grasos no esterificados (*Non-esterified fatty acid*)
- NPY:** Neuropeptido Y (*Neuropeptide Y*)
- PBMC:** Células mononucleares de sangre periférica (*Peripheral blood mononuclear cells*)
- PET:** Tomografía de emisión por positrones (*Positron emission tomography*)
- PGC1:** Coactivador-1 del receptor de peroxisoma activado por proliferador (*Peroxisome proliferator-activated receptor c coactivator 1*)
- POMC:** Pro-opiomelanocortina (*Pro-opiomelanocortin*)
- PPAR:** Factor receptor activado por el proliferador perioxosomal (*Peroxisome proliferator activated receptor*)
- PRDM16:** Cofactor transcripcional PRD1-BF1-RIZ1 homólogo al dominio que contiene proteína 16 (*PRD1-BF1-RIZ1 homologous domain-containing protein-16*)
- SCD-1:** Esteroil coenzima A desaturasa 1 (*Steroyl-coenzyme A desaturase-1*)
- SLC27a1:** Miembro 1 de la familia 27 de transportadores de ácidos grasos (*Solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 1*)

SLC27a2: Miembro 2 de la familia 27 de transportadores de ácidos grasos (*Solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 2*)

SNP: Polimorfismos de un solo nucleótido (*Single nucleotide polymorphism*)

SNS: Sistema nervioso simpático

SREBP: Proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides (*Sterol regulatory element binding protein*)

TAB: Tejido adiposo blanco

TAM: Tejido adiposo marrón

TBX1: Factor de transcripción T-box 1 (*T-box transcription factor 1*)

TBX15: Factor de transcripción T-box 15 (*T-box transcription factor 15*)

TMEM26: Proteína transmembrana 26 (*Transmembrane protein 26*)

TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa (*Tumor necrosis factor alpha*)

UCP1: Proteína desacoplante 1 (*Uncoupling protein 1*)

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad (*Very low density lipoprotein*)



Estudio de las células sanguíneas como fuente de marcadores transcriptómicos de utilidad para la investigación de la obesidad y sus complicaciones

Programa de doctorado Nutrigenómica y Nutrición Personalizada
 Universidad de las Islas Baleares

RESUMEN

La dieta es un determinante fundamental de nuestro estado de salud/enfermedad, y es uno de los principales factores que contribuyen al desarrollo de la obesidad. Por ello, sería interesante disponer de biomarcadores de fácil obtención para determinar cómo afecta la dieta a nuestro metabolismo. Interesan especialmente los biomarcadores tempranos de obesidad, ya que permitirían aplicar estrategias de prevención antes de que aparezca la enfermedad. El objetivo principal de este proyecto de tesis consiste en analizar la utilidad de una fracción de células de la sangre, las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) como herramienta en la búsqueda de biomarcadores para la prevención o tratamiento de la obesidad usando roedores como modelo experimental. En particular, nos hemos centrado en: a) estudiar la capacidad de las PBMC para reflejar alteraciones de la homeostasis energética durante el desarrollo de obesidad inducida por la dieta, analizando su respuesta a cambios en las condiciones de alimentación (ayuno y realimentación); así como evaluar si las PBMC pueden reflejar la pérdida de peso y la recuperación metabólica cuando se sustituye una dieta obesogénica por una dieta equilibrada y saludable; y b) analizar si las PBMC son capaces de reflejar la activación del tejido adiposo marrón o la marronización del tejido adiposo blanco (nuevas dianas de interés en el tratamiento de la obesidad) en respuesta a la ingesta de dietas obesogénicas o como resultado de la exposición al frío.

Los resultados obtenidos muestran que las PBMC son un buen indicador de las adaptaciones metabólicas al ayuno y realimentación, así como de la insensibilidad a cambios en las condiciones de alimentación que se da en animales obesos, alimentados con una dieta obesogénica (dieta de cafetería), desde el inicio del desarrollo de esta enfermedad. Además, estas células son capaces de reflejar la recuperación metabólica asociada a la pérdida de peso, como la respuesta al ayuno a nivel de parámetros séricos y de expresión génica. Las PBMC de animales obesos alimentados con dietas hiperlipídicas reflejan también alteraciones en la expresión basal de genes implicados en diferentes rutas metabólicas relacionadas con el control del peso corporal y en los procesos inflamatorios, proporcionando un perfil obesogénico característico.

Por otra parte, tanto las dietas obesogénicas como la exposición al frío inducen la expresión de marcadores de adipocitos marrones y de adipocitos *brite* en PBMC, reflejando la marronización que se produce en el tejido adiposo blanco. Estas células sanguíneas se perfilan pues como un material biológico de interés para analizar componentes nutricionales o farmacológicos que puedan inducir la remodelación del tejido adiposo blanco a marrón o bien activar el tejido adiposo marrón aumentando así la capacidad disipadora de energía, lo cual abre nuevas perspectivas en el tratamiento de la obesidad.

En definitiva, las PBMC son una herramienta idónea para el estudio de la homeostasis energética, y constituyen una fuente fácilmente obtenible de biomarcadores tempranos de obesidad, útiles para estudiar el desarrollo de estrategias

para la prevención y tratamiento de esta patología y sus complicaciones. Además las PBMC reflejan el proceso de marronización del tejido adiposo inducido por diferentes estímulos, tales como ingesta de dietas ricas en grasa o bien la exposición al frío. En base a estos resultados, podemos afirmar que las PBMC generan nuevas posibilidades terapéuticas y proporcionan un material interesante para la identificación de biomarcadores tempranos de enfermedad que pueden resultar de utilidad en humanos.



Study of blood cells as a useful source of transcriptomic markers for the research of obesity and its complications

Doctoral program in Nutrigenomics and Personalized Nutrition
Universidad de las Islas Baleares

ABSTRACT

Diet is a major determinant of our health/disease status, and it is one of the main factors contributing to the development of obesity. Then, it would be interesting to dispose of easily obtainable biomarkers to determine how the diet affects our metabolism. Particularly, early biomarkers of obesity are of special interest, since they would allow implementing prevention strategies before the appearance of the disease. This thesis is focused in the analysis of the utility of a blood cell fraction, the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) as a source of obesity biomarkers, used for the prevention or treatment of obesity using rodents as animal model. In particular, we focused on the: a) study of the ability of PBMC to reflect energy homeostatic impairment during the development of diet-induced obesity, testing their response to changes in feeding conditions (fasting and re-feeding); as well as testing PBMC capacity to reflect metabolic recovery associated to weight lost in after switching an obesogenic to a control balanced diet; and b) analysis of the ability of PBMC to reflect brown adipose tissue activation or white adipose tissue browning (new focus of interest in obesity treatment) in response to the intake of obesogenic diets or as a result of cold exposure.

Our results show that the PBMC are good indicators of metabolic adaptations to fasting and re-feeding, as well as of fasting insensitivity observed in cafeteria-obese animals since early stages of obesity development. Moreover, PBMC are able to reflect the insensitivity to feeding conditions in obese animals; these cells are able to reflect the metabolic recovery associated to weight loss, as recovery of fasting response of serum parameters and of gene expression. PBMC of animals fed hyperlipidic diets also reflect alteration in basal expression of genes involved in different pathways related to body weight control and in inflammatory processes, providing a characteristic obesogenic gene expression profile.

On the other hand, intake of obesogenic diets as well as cold exposure can induce the expression of brown/*brite* adipocyte markers in PBMC, reflecting the browning process, which occurs in white adipose tissue. Thus, these blood cells constitute a suitable biological material for the analysis of nutritional or pharmacological compounds that could induce white to brown adipose tissue remodelling or activate brown adipose tissue, increasing in this way energy dissipating capacity, opening new perspectives for obesity treatment.

In conclusion, PBMC are a good tool for energy homeostatic studies, and constitute an easily obtainable source of early obesity biomarkers useful to study the development of strategies for the prevention and treatment of obesity and related diseases. Moreover, PBMC reflect the white adipose tissue browning process induced by different stimuli, such as the intake of fat-rich diets or cold exposure. According to these results we can state that PBMC offer new therapeutic possibilities and provide an interesting material to identify early markers of disease, which can be useful in human studies.

Listado de artículos originales derivados de la tesis

La presente Tesis Doctoral ha dado lugar a los siguientes artículos originales:

- 1.- Oliver, P., Reynés, B., Caimari, A., Palou, A. **Peripheral blood mononuclear cells: a potencial source of homeostatic imbalance markers associated with obesity development.** Pflügers Archiv- European Journal of Physiology **465(4):459-68**, 2013.
- 2.- Reynés, B., García-Ruiz, E., Díaz-Rúa, R., Palou, A., Oliver, P. **Reversion to a control balanced diet is able to restore body weight and to recover altered metabolic parameters in adult rats long-term fed on a cafeteria diet.** Food Research International **64:839-848**, 2014.
- 3.- Reynés, B., Díaz-Rúa, R., Cifre, M., Oliver, P., Palou, A. **Peripheral blood mononuclear cells as a potencial source of biomarkers to test the efficacy of weight-loss strategies.** Obesity 8 Oct 2014 [publicación electrónica antes de la impresión].
- 4.- Reynés, B., García-Ruiz, E., Palou, A., Oliver, P. **The intake of high fat diets induces an obesogenic profile in peripheral blood mononuclear cells.** Manuscrito.
- 5.- García-Ruiz, E., Reynés, B., Díaz-Rúa, R., Ceresi, E., Oliver, P., Palou, A. **The intake of high fat diets induces the acquisition of brown adipocyte gene expression features in white adipose tissue.** Manuscrito en vías de publicación.
- 6.- Reynés, B.†, García-Ruiz, E.†, Oliver, P., Palou, A. **PBMC can reflect physiological adaptations of adipose tissue to cold exposure.** Manuscrito.

Mi contribución en cada manuscrito fue:

Manuscrito 1: Realicé la extracción de ARN total y el análisis de expresión génica en PBMC, hígado y tejido adiposo retroperitoneal. También realicé el análisis estadístico así como la representación gráfica de los resultados. Colaboré en la interpretación de los resultados, en la redacción del artículo y en su revisión.

Manuscrito 2: Llevé a cabo la experimentación animal (con la colaboración de otros autores) y la recolección de sangre para la obtención de suero donde analicé los parámetros séricos. Realicé la extracción de ARN y el análisis de expresión génica en hígado y músculo. También participé en el análisis e interpretación de los resultados y redacté una primera versión del manuscrito.

Manuscrito 3: Llevé a cabo la experimentación animal (con la colaboración de otros autores), y la recolección de sangre para la obtención de suero y el aislamiento de PBMC. Realicé el aislamiento, la extracción de ARN y el análisis de expresión génica de las PBMC. Además, analicé los parámetros séricos de interés y realicé el análisis estadístico. Finalmente, participé en la discusión de los resultados y redacté una primera versión del manuscrito.

Manuscrito 4: Llevé a cabo la experimentación animal (con la colaboración de otros autores), y la recolección de sangre para la obtención de suero y el aislamiento de PBMC. Realicé la extracción de ARN, así como el análisis de expresión de los genes de interés y el análisis de los parámetros sanguíneos. Finalmente, llevé a cabo el análisis de datos, participé en la discusión de los resultados, y redacté una primera versión del manuscrito.

Manuscrito 5: Llevé a cabo la experimentación animal (con la colaboración de otros autores). Realicé el aislamiento de PBMC y la extracción de ARN, así como el análisis de expresión de los genes de interés. Finalmente, leí y aprobé la versión final del manuscrito.

En la tesis tan solo presento parte del trabajo de este artículo, el que está directamente implicado con mi trabajo, para lo cual redacté el siguiente manuscrito que es el que se incluye en el capítulo de resultados: **Peripheral blood mononuclear cells express key genes involved in adipose tissue browning and reflect white to brown adipose tissue remodelling capacity in response to the intake of high fat diets.**

Manuscrito 6: Participé en la experimentación animal, en la recolección de sangre para la obtención de suero y en el aislamiento de PBMC . Llevé a cabo la extracción de ARN y el análisis de expresión génica de las PBMC. Además, analicé los parámetros séricos de interés y realicé el análisis estadístico de los resultados. Finalmente, participé en la discusión de los resultados, y redacté una primera versión del manuscrito.

Capítulo I.- INTRODUCCIÓN

I.- INTRODUCCIÓN

La obesidad se ha convertido en el problema de salud más importante y común del siglo XXI. Esta enfermedad, que ha alcanzado niveles epidémicos en las últimas décadas, se define como la acumulación anormal o excesiva de grasa corporal que puede ser perjudicial para la salud. La obesidad es una enfermedad que lleva asociada otras patologías y alteraciones metabólicas como son la diabetes tipo II, las enfermedades cardiovasculares y la hipertensión. El aumento exponencial de la presencia de la obesidad va asociado a un excesivo consumo de alimentos ricos en grasa y a un aumento del sedentarismo, lo que provoca un desequilibrio en el balance energético (Revisado en (Bray and Popkin, 1998; Coelho et al., 2011; Hill and Peters, 1998; Palou et al., 2000)). Por ello, la obesidad es una de las principales causas de muerte evitable. Preocupa especialmente la gran incidencia de esta enfermedad en edades tempranas. En España, hay un elevado grado de sobrepeso y obesidad infantil (40%). Estos niños hoy obesos, serán adultos con sobrepeso u obesidad, que desarrollarán de manera precoz otras alteraciones asociadas, como la diabetes tipo II. Además, no se trata tan solo de un problema de salud, sino que deriva en un problema económico. A día de hoy, en España, el gasto sanitario debido a la obesidad supone un 7% del gasto total (Revisado en (Abel, 2010)).

La obesidad es un desorden multifactorial al que contribuyen múltiples factores genéticos y ambientales (entre ellos y de manera destacada la dieta) así como la interacción entre ambos. El conocimiento de los genes y moléculas implicadas en el desarrollo de esta enfermedad, y de su interacción con la dieta, serán útiles para estudios de nuevas estrategias para la prevención y/o tratamiento de la obesidad.

Debido al aumento de la incidencia de obesidad, hay un gran interés en la búsqueda de biomarcadores, especialmente biomarcadores tempranos, que pongan de manifiesto alteraciones metabólicas antes de que se produzca la ganancia de peso, para poder así prevenir el desarrollo de esta enfermedad. También existe gran interés en el estudio de la posibilidad de recuperación metabólica asociada a la pérdida de peso y adiposidad que se produce al sustituir malos hábitos alimenticios por un estilo de vida y una dieta saludable (Aranceta Bartrina, 2013; Lien et al., 2013). Sería pues interesante identificar marcadores de la recuperación metabólica que permitan conocer la eficacia de las estrategias de pérdida de peso. Si bien la lucha contra la obesidad se centra sobre todo en el control de la ingesta calórica, en los últimos años, el incremento del gasto energético mediante la activación del tejido adiposo marrón o mediante la remodelación del tejido adiposo blanco a marrón (proceso conocido como *browning* o marronización) frente a diferentes estímulos incluida la dieta, ha surgido como una nueva e interesante diana terapéutica. Sin embargo, la obtención de muestras para este tipo de estudios en humanos es complicada.

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC, del inglés *Peripheral blood mononuclear cells*) son una fracción celular formada por linfocitos y monocitos que viajan por el cuerpo humano a través del sistema circulatorio y que son capaces de responder a señales internas y externas. Recientemente se ha descrito que estas células son útiles para el estudio de la homeostasis energética y sus desviaciones en la obesidad (Caimari et al., 2010a; Caimari et al., 2010c). Por tanto, estas células se perfilan como un material biológico muy apropiado para el estudio de biomarcadores de obesidad con aplicabilidad a humanos, evitando así biopsias complicadas de tejidos como el hígado y el tejido adiposo. En esta tesis doctoral se ha profundizado en el estudio de la utilidad de estas células para la obtención de marcadores tempranos de

obesidad, de recuperación metabólica asociada a la pérdida de peso, así como de remodelación del tejido adiposo blanco a marrón.

1.- Células sanguíneas como material biológico de interés en investigación para la obtención de biomarcadores

1.1.- Características y composición de la sangre

La sangre es un líquido contenido en un compartimento cerrado, aparato circulatorio, que circula por todo el organismo con un movimiento regular y unidireccional, forma parte del tejido conjuntivo y está compuesto por células, fragmentos celulares y plasma. Presenta un color rojo característico debido a la presencia de hemoglobina, pigmento presente en los eritrocitos. Principalmente, la sangre es un medio de transporte mediante el cual se llevan a cabo una serie de funciones como distribución y transporte de nutrientes, oxígeno y hormonas a todas las células del organismo, transporte de productos de desecho, dióxido de carbono de las células hacia el exterior, defensa del cuerpo ante agentes infecciosos, y detención de posibles hemorragias. El volumen total de sangre constituye un 7% del peso corporal, y es de aproximadamente 5 litros por persona (Gartner and Hiatt, 2003; Junqueira and Carneiro, 2005).

El plasma es una solución acuosa que comprende el 55% del fluido sanguíneo. Está formado por un 7% de proteínas plasmáticas (globulinas, albúminas y fibrinógeno), un 0,9% de sales inorgánicas (calcio, sodio, potasio y bicarbonato) y el resto compuestos orgánicos diversos como los aminoácidos, vitaminas, hormonas, lípidos y factores de coagulación. Tras la coagulación de la sangre y tras la separación del coágulo, se obtiene una fracción líquida, el suero, que carece de fibrinógeno y demás factores de coagulación (Gartner and Hiatt, 2003; Junqueira and Carneiro, 2005).

Las células de la sangre tienen una vida media corta, por lo que presentan una elevada tasa de renovación. El proceso de formación y maduración de las nuevas células sanguíneas, que tiene lugar en la médula ósea, se llama hemopoyesis (o hematopoyesis). El proceso de hemopoyesis consiste en la proliferación y diferenciación simultánea a partir de una célula madre pluripotencial (*stem cell*), a dos tipos de células progenitoras (mieloide y linfoide) que dan lugar a dos linajes celulares. El linaje mieloide deriva en eritrocitos, plaquetas, mieloblastos (precursores de los leucocitos granulares: eosinófilos, basófilos y neutrófilos) y monoblastos (precursores de leucocitos agranulares: monocitos), mientras que el linaje linfoide deriva en linfoblastos (precursores de leucocitos agranulares: linfocitos (linfocitos B y T y *Natural killer*). Las células madre mieloide y linfoide son células progenitoras uni o bipotenciales que se pueden dividir y formar nuevas células progenitoras o bien células precursoras, también llamadas blastos; a su vez estas células tan solo pueden formar células sanguíneas maduras (Gartner and Hiatt, 2003; Junqueira and Carneiro, 2005). La clasificación de las células sanguíneas está esquematizada en la Figura 1.

1.1.1.- Células sanguíneas

Las células de la sangre se clasifican en: glóbulos rojos (eritrocitos), glóbulos blancos (leucocitos) y plaquetas. Estas células se estudian mediante frotis celulares, donde las células se disponen estiradas y separadas. Generalmente los frotis celulares se tiñen con mezclas especiales para favorecer su observación. Estas mezclas contienen eosina (colorante ácido), azul de metileno (colorante básico) y azules (productores de la oxidación de azul de metileno). Las mezclas más utilizadas son la mezcla de Leishman, Wright y de Giemsa, en las que las estructuras ácidas adquieren

una tonalidad rosa, las básicas azul y las que fijan los azures, azurófilas, son de color púrpura.

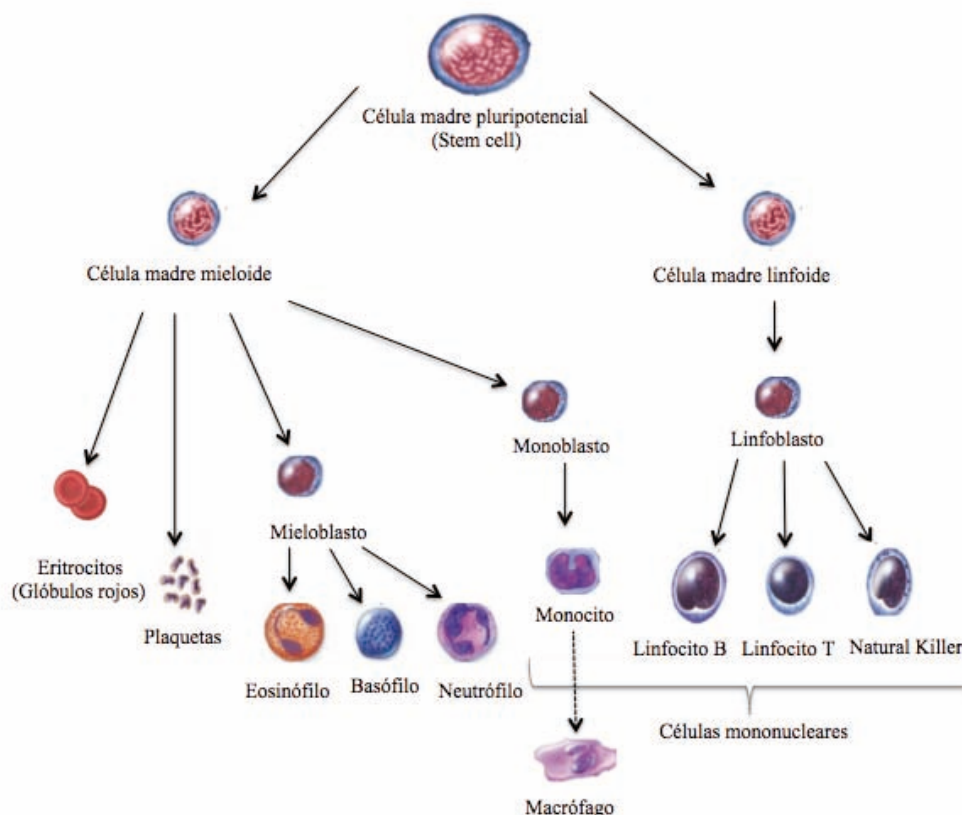


Figura 1. Clasificación de las células sanguíneas.

Los **eritrocitos** o **glóbulos rojos** son las células sanguíneas anucleadas más abundantes en vertebrados. Presentan una forma de disco bicóncavo de 7-8 μm de diámetro, con un grosor de 2,6 μm cerca del borde y 0,8 μm en el centro. El color rojizo que les caracteriza se debe a la gran cantidad de hemoglobina que contienen (proteína transportadora de oxígeno). La hemoglobina (proteína conjugada con hierro) presenta 4 subunidades, cada una con un grupo hemo lo que permite el transporte de oxígeno desde los pulmones a los demás tejidos del cuerpo. La forma bicóncava del eritrocito, le ofrece una gran superficie en relación a su volumen lo que favorece el intercambio gaseoso. Estas células, de forma normal, no salen del torrente circulatorio y presentan una gran elasticidad para poder transportarse dentro de los capilares más finos, y así poder transportar el oxígeno alrededor de todo el cuerpo (Gartner and Hiatt, 2003; Junqueira and Carneiro, 2005).

Las **plaquetas** o **trombocitos** son pequeños fragmentos celulares redondos, de 2-4 μm de diámetro formados de la fragmentación citoplasmática de los megacariocitos, unas células gigantes y poliploides de la médula ósea. Ante una lesión en un vaso sanguíneo se produce el proceso de hemostasia. Este proceso consiste en la adhesión plaquetaria al colágeno acumulado en la lesión vascular, y la transformación de fibrinógeno en fibrina, formando así una malla donde quedan retenidos los eritrocitos dando lugar a un coágulo, impidiendo la pérdida de sangre. Por tanto estos pequeños fragmentos tienen la función de inducir la coagulación y promover la

reparación de la pared de los vasos sanguíneos, evitando hemorragias (Gartner and Hiatt, 2003; Junqueira and Carneiro, 2005).

Los **leucocitos** son células en suspensión, incoloras y de forma esférica. Tienen una función defensiva del organismo, destruyen y eliminan células viejas y atacan a los agentes infecciosos y sustancias extrañas del organismo. Se dividen en dos grupos, polimorfonucleares o granulocitos y mononucleares o agranulocitos (Gartner and Hiatt, 2003; Junqueira and Carneiro, 2005).

Los leucocitos polimorfonucleares o granulocitos presentan un núcleo de forma irregular y un citoplasma con gránulos específicos. Estos gránulos son enzimas unidos a la membrana con la función de digerir las partículas fagocitadas. Los granulocitos tienen una vida media de pocos días, mueren por apoptosis y los restos celulares son fagocitados por macrófagos sin desencadenar una respuesta inflamatoria. En función de la afinidad de tinción de los gránulos específicos se distinguen tres tipos celulares: eosinófilos, basófilos y neutrófilos.

- Los *eosinófilos* forman el 2-4% del total de leucocitos. Tienen un diámetro de 10-14 μm . El núcleo es negro amarronado de forma bilobular, ambos lóbulos unidos por una fina hebra conectora. Los gránulos son específicos, esféricos, grandes de un color naranja rojizo. Están implicados en la defensa de parásitos, y tanto la infección parasitaria como las alergias aumentan mucho el contenido de eosinófilos en sangre (Gartner and Hiatt, 2003; Junqueira and Carneiro, 2005).

- Los *basófilos* son los granulocitos menos numerosos, aproximadamente 0,5% de los leucocitos circulantes. Tienen un diámetro menor que los eosinófilos, de 8-10 μm . El núcleo, azul pálido, presenta una forma tortuosa e irregular, tiene forma de S. En el citoplasma hay una gran cantidad de grandes y oscuros gránulos basófilos específicos, contienen histamina, factores quimiotácticos para eosinófilos y neutrófilos y heparina (Gartner and Hiatt, 2003; Junqueira and Carneiro, 2005).

- Los *neutrófilos*, son los leucocitos más abundantes (60-70%), miden 9-12 μm de diámetro. El núcleo es azul oscuro, grueso y multilobulado, de 2-5 lóbulos (frecuentemente presentan 3 lóbulos) unidos mediante finas hebras conectoras. Las células jóvenes presentan un núcleo no segmentado en forma de bastón curvo y se les llama neutrófilos con núcleo en bastón. El citoplasma es de color rosado claro, donde se encuentran numerosos gránulos azurófilos (lisosomas). Los neutrófilos tienen la función de fagocitar los microorganismos y sustancias extrañas presentes en el organismo, posteriormente son digeridos por los lisosomas. Estas células son incapaces de regenerar el contenido lisosómico de manera que presentan una vida media corta (Gartner and Hiatt, 2003; Junqueira and Carneiro, 2005).

Los leucocitos mononucleares o agranulocitos presentan un núcleo de forma redondeada y no presentan, aparentemente, gránulos en el citoplasma, aunque sí presentan lisosomas que son como gránulos pero que no se tiñen específicamente. Este grupo está compuesto por los monocitos y los linfocitos (Gartner and Hiatt, 2003; Junqueira and Carneiro, 2005).

- Los *monocitos* forman 3-8% de los leucocitos, son las células más grandes de la sangre circulante (12-15 μm de diámetro). Presentan un núcleo excéntrico de forma arriñonada y una gran cantidad de citoplasma azul grisáceo que contiene abundantes gránulos azurófilos (lisosomas) muy finos. Los monocitos pueden abandonar el torrente sanguíneo y pasar a los espacios del tejido conectivo donde se convierten en macrófagos. Los macrófagos son células que intervienen en la

fagocitosis de sustancias extrañas y contribuyen a la activación del sistema inmunológico de los linfocitos. De la misma manera que los neutrófilos, la principal función de los monocitos es la de fagocitosis, pero estos tienen la capacidad de renovar el contenido de los lisosomas una vez han fagocitado un agente extraño y por lo tanto tienen una vida media más larga (Gartner and Hiatt, 2003; Junqueira and Carneiro, 2005). Los macrófagos constituyen una importante función de defensa celular innata, contra la invasión de microorganismos y sustancias extrañas. Además de fagocitar y digerir las sustancias extrañas y microorganismos, presentan fragmentos de los patógenos y activan el sistema inmune adaptativo (Delves et al., 2011).

○ Los *linfocitos* son las principales células del sistema inmune que suponen el 20-30% de los leucocitos circulantes. Son células esféricas, hay de diferentes tamaños, pequeños, medianos y grandes. Los más abundantes en la sangre son los linfocitos pequeños que miden entre 6-8 μm de diámetro, aunque los grandes pueden llegar a medir hasta 18 μm . El núcleo de los linfocitos pequeños es esférico, aunque a veces presentan una pequeña escotadura; la cromatina forma grumos gruesos lo que hace que presente un color oscuro y sea fácil de reconocer en las preparaciones habituales. El citoplasma es escaso, basófilo por lo que se tiñe de color azul claro, puede contener gránulos azulófilos (lisosomas) como los monocitos (Gartner and Hiatt, 2003; Junqueira and Carneiro, 2005). A diferencia de los demás leucocitos que no vuelven a la sangre, después de migrar a los tejidos, los linfocitos retornan de los tejidos a la sangre, recirculando continuamente. Se distinguen tres tipos de linfocitos: linfocitos T, linfocitos B y *Natural killer*; aunque todos ellos se originan en la médula ósea a partir de la célula madre precursora, los linfocitos T completan su maduración en el timo, mientras que los linfocitos B salen de la médula ósea ya maduros. Los dos tipos principales de linfocitos (B y T) con sus subtipos se diferencian por los receptores presentes en sus membranas (Gartner and Hiatt, 2003; Junqueira and Carneiro, 2005).

⇒ Los linfocitos B representan el 5-10% de los linfocitos de la sangre, cada uno de ellos presenta en la membrana celular 150.000 moléculas de inmunoglobulinas M (receptores de los antígenos). Estos linfocitos se originan y maduran en la médula ósea. Pasan al torrente sanguíneo y son transportados a los órganos linfoides donde se instalan (a excepción del timo). Cuando estos linfocitos son activados por los antígenos, proliferan y se diferencian en células productoras de anticuerpos (células plasmáticas), sin embargo algunos de estos linfocitos no se diferencian en células productoras de anticuerpos sino que se convierten en células de memoria que responden rápidamente ante una segunda exposición a este antígeno (Junqueira and Carneiro, 2005).

⇒ Los linfocitos T representan el 65-75% de los linfocitos en sangre. Estos linfocitos se originan en la médula ósea, y proliferan y se diferencian en las diferentes subpoblaciones de linfocitos T (células T colaboradoras, células T supresoras y T citotóxicas) en el timo. Al igual que los linfocitos B, una vez diferenciados son liberados al torrente sanguíneo donde se transportan hacia otros órganos linfáticos, donde se forman las células de memoria (Junqueira and Carneiro, 2005). Las células T colaboradoras estimulan la transformación de linfocitos B en células plasmáticas. Las células T supresoras inhiben la respuesta humoral y celular, y estimulan el fin de la respuesta inmunológica. Por su parte, las células T citotóxicas actúan sobre las células extrañas o infectadas por virus, abriendo orificios en la membrana plasmática a través de las perforinas, y provocando la lisis celular.

⇒ *Natural killer* (NK), suponen el 10-15% de los linfocitos circulantes. No presentan las mismas proteínas de membrana que los linfocitos T y B. Reciben este nombre ya que son capaces de atacar y eliminar a células infectadas por virus o células cancerosas, sin ser estimulados previamente (Junqueira and Carneiro, 2005).

1.2.- Células mononucleares de sangre periférica (PBMC): características y aplicaciones

De las células presentes en la sangre, las PBMC, presentan unas características que las hacen especialmente interesantes en investigación. Las PBMC pueden aislarse directamente a partir de la sangre total por centrifugación y por tanto representan una fuente de células fácilmente accesibles. Están compuestas principalmente por linfocitos (aproximadamente 80-85%) y monocitos (el porcentaje restante), por lo que forman parte del sistema inmunitario. Los linfocitos pertenecen al sistema inmune adaptativo, son responsables de las respuestas inflamatorias y participan en procesos de reparación tras el daño tisular. Producen citoquinas como la interleuquina 6 (IL-6, *Interleukin 6*), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α , *Tumor necrosis factor alpha*) o el interferón-gamma, entre otros, como respuesta aguda a la inflamación (Löffler and Petrides, 1998; Ramirez-Boo et al., 2006; Schulz et al., 2007). Por su parte, los monocitos forman parte del sistema inmune innato y producen moléculas biológicamente activas como citoquinas, quimoquinas, moléculas de adhesión y enzimas que participan en la transducción de señales en muchos estados patológicos (Hryniewicz-Jankowska et al., 2007).

Las PBMC circulan constantemente a través del cuerpo interactuando con todas las células y tejidos proporcionando una función defensiva. Además, al estar en circulación, están en contacto con señales tanto internas (hormonas y demás señales) como externas (tales como nutrientes y derivados) frente a las que son capaces de reaccionar, ya que el patrón de expresión génica de las PBMC se ve afectado por cambios en el macro- y microambiente (de Mello et al., 2012). Las PBMC expresan un gran porcentaje (más del 80%) de los genes del genoma humano, incluyendo transcritos tisulares específicos. De esta manera, estas células co-expresan una gran cantidad de genes con los diferentes tejidos (por ejemplo, un 83% de los genes del hígado (Liew et al., 2006)).

Por tanto, estas células pueden servir para “monitorizar” las respuestas de órganos y tejidos, proporcionando información valiosa sobre el estado de salud del organismo y sobre los efectos de las intervenciones dietarias en el metabolismo. Las PBMC se han convertido pues en una nueva y potencial herramienta para la identificación de **biomarcadores**: para el diagnóstico temprano de alteraciones metabólicas/enfermedad, de respuesta a la dieta, y para el estudio de los efectos de la nutrición sobre la salud.

El uso de las PBMC para la búsqueda de biomarcadores de salud/enfermedad, sobre todo en el ámbito de la nutrición y la obesidad, es precisamente uno de los objetivos principales del proyecto europeo BIOCLAIMS “*BIOMarkers of Robustness of Metabolic Homeostasis for Nutrigenomics-derived Health CLAIMS Made on Food*” (no. 244995), coordinado por nuestro grupo de investigación.

1.2.1.- PBMC en estudios clínicos

Las PBMC son un material ampliamente utilizado con fines de diagnóstico clínico ya que son capaces de reflejar patrones de expresión característicos de determinadas enfermedades, sobre todo de tipo inmunológico, aunque no exclusivamente (Aziz et al., 2007; Olsen et al., 2004b; Sala et al., 2014). Así, por ejemplo, las PBMC se han utilizado para la detección del virus del VIH, ya que los linfocitos T colaboradores, las células infectadas por dicho virus, forman parte de las PBMC (d'Ettorre et al., 2010).

Los estudios de enfermedades del sistema inmune se realizaban tradicionalmente en tejidos como líquido sinovial, cerebro o piel de pacientes enfermos. Aparte de la dificultad de obtención de la muestra, era muy complicado estudiar las primeras fases la aparición de la enfermedad, cuando las intervenciones terapéuticas son más efectivas. Por todo ello se propuso determinar si las PBMC, al ser células del sistema inmune, reflejaban los cambios clínicamente relevantes en la expresión génica. El uso de las PBMC como material biológico daba la posibilidad de obtener muestras más fácilmente y de manera más repetida. De esta manera, las PBMC han abierto la posibilidad de determinar indicadores patológicos tempranos, así como indicadores de pronóstico de una manera más sencilla y en poco tiempo (Olsen et al., 2004b).

En los últimos años ha aumentado el estudio en PBMC de enfermedades de carácter autoinmune como esclerosis múltiple, artritis reumatoide, lupus sistémico eritromatoso y diabetes mellitus tipo I (Olsen et al., 2004b). Muchos investigadores se han concentrado en la posibilidad de que la sangre periférica podría mostrar una correlación entre la expresión génica y el estado de la enfermedad (Becker et al., 2013). Por ejemplo, en un estudio de esclerosis múltiple se ha visto como hay diferencias en la expresión génica entre individuos sanos y enfermos, aunque estas diferencias son menores entre individuos con diferente grado de enfermedad (Ratzer et al., 2013). Recientemente, en los estudios de desórdenes inmunitarios en PBMC también se ha determinado la relación con los microARN. Por ejemplo, en humanos se ha revelado una asociación entre enfermos de esclerosis múltiples y una expresión alterada de microARN en PBMC (Hecker et al., 2013).

Pero las PBMC no tan solo reflejan cambios patrones de expresión génica característicos de enfermedades autoinmunitarias, sino que también son útiles para el estudio de otras enfermedades, como el asma y alergias (Ma et al., 2013), enfermedad crónica del riñón (Chen et al., 2013), párkinson (Sala et al., 2014), cáncer (Ganapathi et al., 2014), enfermedades cardiovasculares (Aziz et al., 2007), diabetes tipo II u obesidad (de Mello et al., 2012), existiendo un patrón de expresión génica diferencial entre individuos sanos y enfermos. Por ejemplo, el análisis de expresión génica en PBMC sirve para estudiar enfermedades como la insuficiencia cardíaca crónica (Cappuzzello et al., 2009). El análisis de microARN en PBMC, también es útil para el diagnóstico de determinadas enfermedades. Por ejemplo, se ha encontrado una clara relación entre la expresión de algunos microARN y la presencia de cáncer (Zeng et al., 2013).

Como parte de su aplicación en clínica, el análisis de expresión génica en PBMC también es útil para el estudio de la respuesta a determinados fármacos, como por ejemplo los corticosteroides. Los corticosteroides son un fármaco recomendado para el tratamiento del asma, sin embargo hay casos donde existe una resistencia a este tratamiento. Las PBMC reflejan a nivel transcriptómico la regulación génica por

esteroides, por ello mediante estudios *in vitro* se puede evaluar la capacidad de respuesta a estos fármacos de los individuos asmáticos (Goleva et al., 2012).

1.2.2.- PBMC en estudios de nutrición y obesidad

De manera más reciente, también se están utilizando las PBMC para la búsqueda de biomarcadores en estudios de nutrición y obesidad. Las PBMC son un tejido diana prometedor en el campo de la nutrigenómica ya que reflejan, a nivel de expresión génica, las modificaciones dietéticas (de Mello et al., 2012). Por otra parte, como se ha descrito en el apartado anterior, las PBMC son capaces de reflejar patrones de expresión característicos de diferentes patologías, entre ellas la obesidad (Sánchez et al., 2012).

1.2.2.1.- PBMC y biomarcadores de efectos nutricionales

Las PBMC se están perfilando como una herramienta muy útil para profundizar en el efecto beneficioso sobre la salud de determinados nutrientes (Khymenets et al., 2009). Diferentes estudios ponen de manifiesto que estas células son capaces de responder, a nivel de expresión génica, ante dietas o nutrientes específicos (Bouwens et al., 2009; Browning et al., 2014; Caimari et al., 2010c).

Las PBMC reflejan los efectos de compuestos nutricionales sobre enfermedades inflamatorias. Por ejemplo, un estudio realizado en niños asmáticos mostró como la suplementación dietética con ácido graso eicosapentanoico mejora el perfil de expresión génica anti-inflamatorio (Covar et al., 2010). Otro estudio, realizado con pacientes con alzhéimer, muestra como una suplementación con ácidos grasos omega-3 aumenta la expresión, en PBMC, de genes implicados en procesos anti-inflamatorios, lo cual favorece el tratamiento de esta enfermedad (Vedin et al., 2012). Estas células no tan solo reflejan el efecto de compuestos nutricionales específicos sobre enfermedades inflamatorias, sino que son capaces de reflejar la respuesta nutricional típica de los órganos implicados en la homeóstasis energética, como el hígado. Así, por ejemplo, estudios en humanos muestran como la suplementación con ácidos grasos poliinsaturados, polifenoles y L-carnitina regulan la expresión de los genes implicados en el metabolismo de los ácidos grasos en PBMC, siguiendo el mismo patrón que en los hepatocitos (Radler et al., 2011). Estudios complementarios, realizados en cultivos celulares de linfocitos y monocitos, muestran como tratamientos con ácidos grasos poliinsaturados, polifenoles y L-carnitina incrementan la expresión de genes implicados en la β -oxidación de los ácidos grasos (Radler et al., 2011).

Por otra parte, estas células también se utilizan para reflejar el efecto de cambios dietéticos. Estudios recientes realizados en humanos ponen de manifiesto que la restricción dietética de grasas, así como la reintroducción dietética del colesterol inducen, en las PBMC, cambios en la expresión de genes implicados en la homeostasia de colesterol en el hígado (Boucher et al., 1998; Boucher et al., 2000).

1.2.2.2.- PBMC y biomarcadores de obesidad

En los últimos años ha aumentado la investigación sobre biomarcadores y factores de riesgo para el desarrollo de la obesidad. En especial, ha aumentado el interés hacia la investigación de biomarcadores tempranos para detectar la obesidad

cuando aún son eficaces las intervenciones nutricionales o de cambios de estilo de vida. Uno de los ámbitos más estudiados son los factores de riesgo de la obesidad en edades tempranas, que pueden suponer predictores importantes del desarrollo de la obesidad. Por ejemplo, son considerados factores de riesgo, el índice de masa corporal de las madres, los patrones de crecimiento, así como la obesidad infantil (Brisbois et al., 2012). Se han estudiado diferentes tipos de biomarcadores útiles en estudios de prevención o de tratamiento de la obesidad. La obesidad está asociada a una alteración del sistema inmunitario y con un estado de inflamación crónico, lo que permite obtener marcadores en células de sistema inmunitario (Bellows et al., 2011; O'Rourke et al., 2013).

Las PBMC son un buen material biológico para la detección de biomarcadores de la obesidad, por lo que estas células abren un nuevo camino a la ciencia hacia el desarrollo de técnicas menos invasivas en la detección y prevención de enfermedades. Se ha descrito que las PBMC reflejan los cambios en la expresión de biomarcadores de inflamación que se ven alterados en condiciones de obesidad. Así, por ejemplo, han demostrado que estas células presentan un aumento de la expresión génica del gen que codifica para la resistina en mujeres que padecen diabetes tipo II, complicación estrechamente relacionada con la obesidad, además de un aumento en la expresión de los genes para citoquinas inflamatorias como interleuquina uno beta (IL-1 β , *Interleukin 1 beta*), TNF α e IL-6, que podrían ser utilizados como marcadores (Tsiotra et al., 2008). Además, la expresión génica de citoquinas proinflamatorias en PBMC está asociada a la distribución de la grasa corporal (Hermsdorff et al., 2010). También se han descrito cambios en la expresión génica en PBMC del gen que codifica para la IL-8, como resultado de cambios en el porcentaje de masa grasa en respuesta a dietas bajas en calorías (Crujeiras et al., 2008b). Por tanto, las PBMC se perfilan como una fuente potencial de biomarcadores de obesidad. Muchos de los genes que codifican para elementos del sistema inmunitario reflejan en estas células el metabolismo de tejidos clave para la homeostasis energética y sus alteraciones en la obesidad (ver apartado **2.6.- Modelos animales para el estudio de la obesidad y la pérdida de peso**). Por otra parte, también se ha demostrado que toda una red de biomarcadores, desde genes, proteínas o metabolitos expresados en PBMC, resultan modulados por fármacos antiinflamatorios, como el diclofenaco (van Erk et al., 2010). La integración de toda una red de biomarcadores es muy útil para el estudio de tratamientos contra la obesidad y enfermedades relacionadas, bien sean dietéticos o farmacológicos (van Erk et al., 2010). Otro tipo de biomarcadores en PBMC son los microARN, ya que diferencias en la expresión basal de determinados microARNs, como mir-935 o mir-4772, pueden ser usados para el pronóstico de la pérdida de peso asociada a dietas hipocalóricas (Milagro et al., 2013). En conjunto, las PBMC permiten tanto el estudio proteómico como transcriptómico, y junto con los metabolitos sanguíneos, posibilitan estudiar una red de biomarcadores con muestras sanguíneas, sin tener que recurrir a biopsias de tejidos, como el hígado o tejido adiposo.

La búsqueda y validación de biomarcadores tempranos en PBMC mediante las nuevas tecnologías asociadas al estudio de la genómica funcional, facilitan un conocimiento avanzado acerca de la propensión a padecer una determinada patología en individuos específicos. Así, es de esperar que la aplicación de buenos biomarcadores tempranos contribuirá tanto a la detección de la obesidad como a la mejor definición de la misma, lo que permitiría diseñar actuaciones preventivas adecuadas, junto con actuaciones en la dieta y/o en el estilo de vida. Además, estos

biomarcadores serán útiles también para entender y estudiar la respuesta a fármacos y nutrientes de manera personalizada.

2.- Homeostasis energética y obesidad: papel de las PBMC

En las últimas décadas ha aumentado el interés sobre el estudio de la homeostasis energética, órganos y sistemas implicados, con el objetivo de entender el desarrollo de la obesidad, así como poder generar mecanismos de actuación y terapias de prevención y revertir los efectos de dicha patología.

El concepto de homeostasis energética se basa en el principio de la termodinámica, la energía no puede ser destruida, solo puede ser disipada, ganada o almacenada en los organismos. El balance energético se define como el estado en que la energía ingerida es igual a la gastada, situación en la que se mantiene el peso corporal. Los organismos son capaces de adaptarse a periodos de ayuno disminuyendo el gasto energético y optimizando las reservas energéticas, así como de responder a periodos con exceso de energía, aumentando el gasto de energía para mantener el balance energético y el peso corporal. Sin embargo, cambios sostenidos en la ingesta o bien en el gasto energético de un individuo pueden resultar en cambios en el peso corporal (Hill et al., 2013). Así, un balance energético positivo, cuando la ingesta energética es mayor al gasto, indica un aumento de peso corporal, y alrededor de un 60-80% de este aumento es en forma de grasa corporal (Hill et al., 2012; Hill et al., 2013; Webber, 2003), de manera que un balance energético positivo mantenido está asociado al desarrollo de la obesidad (Revisado en (Hill et al., 2012; Palou, 2006; Webber, 2003)).

El cerebro, concretamente el hipotálamo, desempeña un papel central en el control de la ingesta de alimentos y en el equilibrio energético. El hipotálamo integra y coordina señales centrales y periféricas que regulan la homeostasis energética, como la calidad y cantidad de calorías que se consumen, los niveles de reservas energéticas en plasma y la cantidad de energía presente en los diferentes depósitos de almacenamiento (a través de señales de adiposidad, tales como insulina y leptina), por ello es el principal órgano regulador de la homeostasis energética (Revisado en (Palou and Bonet, 2013; Sahu, 2004)). La insulina es liberada por las células β -pancreáticas en respuesta a los nutrientes circulantes (glucosa y aminoácidos), mientras que la leptina es liberada principalmente por el tejido adiposo e informa al cerebro de las reservas energéticas en forma de grasa; además, es liberada por la mucosa gástrica que actúa de señal de saciedad en el estado postprandial. La leptina y la insulina son las principales hormonas reguladoras del balance energético, ya que ambas indican de las reservas energéticas disponibles (Palou et al., 2000).

El segundo órgano regulador del balance energético es el hígado. Es el único órgano considerado metabólico, endocrino y exocrino, por las diversas funciones que desempeña: absorción de nutrientes del intestino, formación de sales biliares y factores de coagulación críticos, metabolismo de xenobióticos (como por ejemplo, fármacos, insecticidas...), participación en el metabolismo lipídico y mantenimiento de la homeostasis de la glucosa. Su implicación en el metabolismo de la glucosa y en el metabolismo lipídico lo convierte en un órgano clave para el balance energético (Brock and Dorman, 2007).

Otro órgano importante en el mantenimiento del balance energético es el tejido adiposo. Este órgano no tan solo se encarga del almacenamiento del exceso de energía

en forma de grasa (tejido adiposo blanco) y de disipar la grasa en forma de calor (tejido adiposo marrón), sino que también produce y libera un gran número de adipoquinas o adipocitoquinas, como puedan ser leptina, adiponectina, resistina y visfatina; se trata de moléculas metabólicamente muy activas que desempeñan diferentes funciones metabólicas (Klaus, 2004).

El músculo esquelético es el órgano que más contribuye al gasto energético en adultos (30-40%). Es el órgano donde tiene lugar la mayor oxidación de ácidos grasos y glucosa para la obtención de energía. La captación de glucosa en el músculo para su oxidación está controlada en un 80% por la insulina, por ello este órgano es capaz de responder a las condiciones de ayuno, mostrando una gran flexibilidad en el uso de grasa o glucosa ante la falta de energía. Análisis transcriptómicos de microarrays muestran como durante periodos de ayuno hay alteraciones en el perfil de transcripción génica en músculo esquelético, promoviéndose las rutas catabólicas e inhibiéndose las rutas anabólicas, restableciendo los niveles de trifosfato de adenosina (ATP, *Adenosine triphosphate*) intracelulares (Revisado en (de Lange et al., 2007; Kelley, 2005; Pilegaard et al., 2003)).

El estudio de la homeostasis energética a nivel molecular en humanos padece de una gran limitación, ya que requiere de muestras complejas como biopsias de hígado o tejido adiposo de difícil extracción. Pero en los últimos años se ha abierto una gran ventana a la investigación sobre balance energético, ya que hay estudios que demuestran que la expresión génica en las PBMC refleja el metabolismo de órganos clave en el mantenimiento del balance energético como hígado y tejido adiposo (Caimari et al., 2010b; de Mello et al., 2012; Konieczna et al., 2014). Estas células se perfilan pues, como una herramienta interesante para llevar a cabo estudios de homeostasis energética, evitando tener que recurrir a muestras de más difícil obtención y, además, dada su facilidad de recolección, ofrecen la posibilidad de realizar estudios a lo largo del tiempo. Además, recientemente se ha visto cómo las células sanguíneas (Sánchez et al., 2012), y especialmente las PBMC (Caimari et al., 2010b), son capaces de reflejar las alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad (Caimari et al., 2010a; Caimari et al., 2010c).

2.1.- Principales hormonas implicadas en el mantenimiento de la homeostasis energética

Algunas de las moléculas más importantes en el control de la homeostasis energética son: insulina, glucagón, leptina, adiponectina, resistina y visfatina, además de péptidos hipotalámicos como el neuropéptido Y (NPY) o el péptido relacionado con la proteína agoutí (AGRP) (Gale et al., 2004). Interesantemente, las PBMC expresan leptina, resistina y visfatina, y además son una diana clara de la insulina y glucagón, por lo que son capaces de reflejar la homeóstasis energética (Neal et al., 1983; Powers et al., 1980).

La **insulina** es una hormona secretada por las células β -pancreáticas en respuesta al estado nutricional. Tras la ingesta, y ante un aumento de los niveles circulantes de glucosa, se libera insulina que posibilita la captación de glucosa por los tejidos periféricos y permite su correcta metabolización: estimula la glucólisis, la lipogénesis y otros procesos anabólicos, y además estimula la glucogenogénesis en el hígado. De esta manera los niveles de glucosa en circulación bajan y se restablece la glucemia. Está bien descrito que las alteraciones en los niveles de insulina se asocian a alteraciones en la homeostasis energética, como la obesidad o diabetes tipo II

(Lehninger et al., 2000). El **glucagón** es una hormona con la función contraria a la insulina, también es secretada por el páncreas, pero en este caso ante bajas concentraciones de glucosa circulante. Para aumentar la liberación de glucosa, el glucagón induce la glucogenólisis y la gluconeogénesis, e inhibe la glucogenogénesis y la glucólisis en el hígado (Jiang and Zhang, 2003). Las PBMC son dianas de ambas hormonas.

La **leptina** juega un papel muy importante en diversos procesos fisiológicos, pero sobretodo está implicada en el mantenimiento de la homeostasis energética. Es una proteína glicosilada de 16 KDa, formada por 146 aminoácidos (Gale et al., 2004), producida sobre todo por el tejido adiposo, aunque también es secretada por otros tejidos como, estómago (Cinti et al., 2001; Cinti et al., 2000), placenta (Ashworth et al., 2000; Masuzaki et al., 1997), músculo esquelético (Wang et al., 1998), glándula mamaria (Casabiell et al., 1997) y PBMC (Santos-Alvarez et al., 1999). Esta hormona es liberada al torrente circulatorio principalmente por el tejido adiposo, por lo que los niveles de leptina son proporcionales a la cantidad de grasa presente en el organismo y disminuye la ingesta produciendo una sensación de saciedad y aumenta el gasto energético actuando a nivel de sistema nervioso central (SNC). Por otra parte, al ser secretada por el estómago esta hormona también tienen la función de informar al cerebro sobre las condiciones de alimentación, la leptina es liberada por el estómago tras la ingesta y promueve la actividad metabólica y el gasto energético (Palou et al., 2000). Debido a su importante función en la homeostasis energética, alteraciones genéticas asociadas a la leptina o a su receptor van ligadas a enfermedades metabólicas como la obesidad. En 1978, Coleman definió que los ratones obesos que no presentaban el gen *ob* (*ob/ob*), que codifica para la leptina, carecían de los efectos reguladores de esta hormona, y que ratones obesos a los que les faltaba el gen que codifica para el receptor de la leptina (*db/db*), eran resistentes a su acción (Coleman, 1978). Aunque en humanos son poco frecuentes los casos de obesidad genética asociados a la vía de señalización de esta hormona (Clément et al., 1998), sí son frecuentes aquellos casos en que los individuos presentan resistencia a los efectos de esta hormona debido a elevados niveles circulantes de la misma (Maffei et al., 1995). Las PBMC expresan tanto leptina como su receptor, de manera que esta hormona ejerce múltiples efectos sobre estas células (Sánchez-Margalet et al., 2003). Por ejemplo, estudios *in vitro* muestran cómo concentraciones altas de leptina inducen la producción de moléculas proinflamatorias (TNF α o IL-6) en las PBMC, debido a que la hormona activa directamente los monocitos y los linfocitos T, y éstos a su vez son activados por los monocitos (previamente activados) produciendo una amplificación de la respuesta proinflamatoria (Santos-Alvarez et al., 1999; Sánchez-Margalet et al., 2003).

La insulina y leptina son hormonas anorexigénicas que actúan a nivel central, ya que ambas hormonas son secretadas de manera proporcional a los depósitos de grasa induciendo el estímulo de saciedad a nivel del SNC. La leptina e insulina circulantes llegan al cerebro por la vía hematoencefálica y se unen a sus receptores localizados en dos poblaciones de neuronas hipotalámicas productoras de péptidos orexigénicos y anorexigénicos. Una de las poblaciones de neuronas hipotalámicas son las que sintetizan y liberan dos péptidos orexigénicos (inductores del apetito): el NPY, y el AGRP; la leptina y la insulina reduce la expresión de estos péptidos hipotalámicos, inhibiendo la inducción del apetito. La otra población de neuronas hipotalámicas, codifica para péptidos anorexigénicos: la hormona estimuladora de los melanocitos- α (MSH- α), derivada de la pro-opiomelanocortina (POMC) y el transcrito relacionado

con la cocaína y anfetamina (CART). Por tanto, la presencia de leptina e insulina inhiben el apetito como resultado de la supresión de los péptidos orexigénicos y de la inducción de los anorexigénicos, mientras que la ausencia de estas hormonas produce la respuesta contraria (Revisado en (Gale et al., 2004; Jéquier, 2002; Palou et al., 2000)).

La **adiponectina** es una hormona secretada principalmente por el tejido adiposo. En el plasma de humanos se encuentra en grandes cantidades en forma de homopolímeros. La adiponectina actúa como hormona sensibilizadora de la insulina, por ello en individuos obesos o diabéticos tipo II sus niveles están disminuidos. Además, en humanos existe una correlación negativa entre los niveles de adiponectina y el peso corporal, masa grasa y niveles de insulina (Gale et al., 2004).

Otra hormona secretada por el tejido adiposo es la **resistina**, su nombre viene de la resistencia a la insulina, ya que se define como un antagonista de la acción de la insulina (Revisado en (Gale et al., 2004; Steppan et al., 2001)). En 2001, Steppan y colaboradores (Steppan et al., 2001) demostraron que los niveles de resistina disminuyen con tratamientos antidiabéticos como la rosiglitazona y aumenta, al igual que la insulina, en individuos con obesidad inducida por dieta u obesidad genética. La **visfatina** es una hormona secretada por el tejido adiposo que mimetiza los efectos de la insulina. Esta hormona se une al receptor de la insulina en un sitio distinto del de la insulina, induciendo una situación de hipoglucemia, ya que reduce la liberación de glucosa en los hepatocitos y estimula su captación y utilización en los demás tejidos. La visfatina tiene tanto función endocrina, autocrina como paracrina, ya que modula la proliferación celular, la biosíntesis de nicotinamida mono-y dinucleótido, así como tiene un efecto hipoglucemiante (Adeghate, 2008). Las PBMC expresan resistina, y visfatina, y su expresión se ve aumentada en individuos diabéticos junto con otras citoquinas y adipoquinas, agravando el estado proinflamatorio asociado a la obesidad (Tsiotra et al., 2008; Tsiotra et al., 2007).

2.2.- El tejido adiposo y su función en la homeostasis energética

El tejido adiposo puede dividirse en dos tipos: tejido adiposo blanco (TAB) y tejido adiposo marrón (TAM), estructural y funcionalmente diferentes. El tejido adiposo se encuentra muy inervado por fibras nerviosas y vascularizado por vasos sanguíneos, si bien esta inervación y vascularización es mayor en el TAM que en el TAB. Ambos, TAB y TAM, están implicados en el metabolismo lipídico y en el mantenimiento y regulación de la homeostasis energética. El TAB está especializado en el almacenaje de energía en forma de triglicéridos, mientras que el TAM lo está en la disipación de energía en forma de calor, proceso conocido como termogénesis adaptativa (Revisado en (Cannon and Nedergaard, 2004; Cinti, 2005)).

Los **adipocitos blancos** presentan una gran vacuola lipídica en el citoplasma, por lo que reciben el nombre de adipocitos uniloculares (Figura 2). Estos adipocitos se encargan de almacenar el exceso de energía en forma de triglicéridos después de las comidas, y de movilizarlo a los demás tejidos, en periodos de ayuno o entre comidas. Además, los adipocitos blancos también ejercen una función secretora liberando una serie de adipoquinas importantes en el mantenimiento de la homeostasis energética. La principal hormona secretada por el tejido adiposo es la leptina, hormona que promueve el gasto energético e induce saciedad al activar la expresión de péptidos hipotalámicos (ver apartado **2.1.- Principales hormonas implicadas en el mantenimiento de la homeostasis energética**) (Revisado en (Cinti, 2005; Palou et al., 1998)).

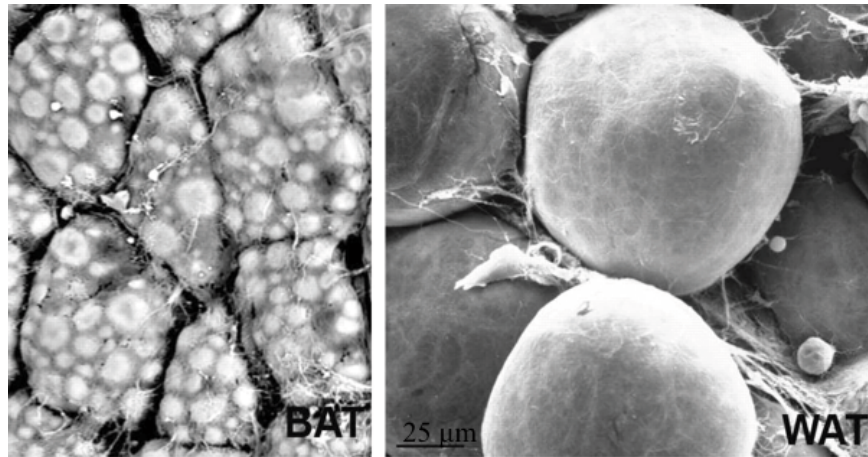


Figura 2. Imágenes de microscopía electrónica de barrido. A la izquierda, adipocitos marrones y a la derecha adipocitos blancos. Los adipocitos marrones presentan una morfología poliédrica con un gran número de vacuolas lipídicas, mientras que los adipocitos blancos cuentan con una única gran vacuola lipídica ocupando el citoplasma. Adaptada de Cinti S., et al. 2009 (Cinti, 2009).

Los **adipocitos marrones** presentan menor tamaño que los blancos y contienen menor cantidad de lípidos. Estos adipocitos almacenan pequeñas vacuolas lipídicas en el citoplasma celular, por lo que se les conoce como adipocitos multiloculares, que están muy inervados por el sistema nervioso simpático (SNS) (Figura 2). Los adipocitos marrones contienen muchas mitocondrias con la característica diferencial que expresan una la proteína desacoplante 1 (**UCP1**, *Uncoupling protein 1*), exclusiva de este tejido. La UCP1 se encuentra en la membrana mitocondrial interna, y es capaz de mediar un desacoplamiento fisiológico de la fosforilación oxidativa mitocondrial, ya que actúa permeabilizando la membrana mitocondrial interna al paso de protones, de manera que la energía liberada por la oxidación de los sustratos es en forma de calor (Cannon and Nedergaard, 2004; Palou et al., 1998; Ricquier and Bouillaud, 2000).

El tejido adiposo blanco se distribuye en diferentes depósitos, que pueden dividirse en viscerales y subcutáneos. Esta distribución es importante, ya que los depósitos grasos presentan características fisiológicas específicas dependiendo de su localización (Rosen and Spiegelman, 2014). Los depósitos de grasa visceral juegan un papel importante en el desarrollo de enfermedades metabólicas, tales como la obesidad y diabetes, mientras que la acumulación de grasa subcutánea no presenta efectos tan adversos para la salud (Lee et al., 2013a). En roedores, los principales depósitos viscerales incluyen los depósitos retroperitoneal (distribuidos lateralmente y que rodea los riñones), mesentérico (rodeando la masa intestinal) y perigonadal (rodeando las gónadas); mientras que los depósitos subcutáneos incluyen básicamente el depósito inguinal (localizado a la altura de las ingles) (Cinti, 2005). Esta distribución es diferente a la que presentan los humanos, pero en ambos casos la grasa depositada visceralmente se asocia a efectos adversos sobre la salud.

2.2.1.- El tejido adiposo y el metabolismo lipídico

El tejido adiposo desempeña un importante papel en la regulación del balance energético y la homeostasis nutricional (Rosen and Spiegelman, 2014). La función principal del TAB es almacenar energía en forma de triglicéridos, para suministrar combustible a todo el organismo en situaciones donde se incrementa la demanda energética. El tejido adiposo está implicado tanto en la hidrólisis de triglicéridos (lipólisis), como en la síntesis de grasa y adipocitos (lipogénesis y adipogénesis), pero existen diferencias sustanciales a nivel de expresión de genes implicados en el metabolismo lipídico en los diferentes depósitos de TAB, que se pueden relacionar con sus características morfológicas. Por ejemplo, el TAB retroperitoneal, con adipocitos grandes y con poca celularidad, presenta mayor expresión de los genes implicados en la lipólisis y lipogénesis que los depósitos mesentérico e inguinal, sugiriendo una mayor capacidad de almacenamiento y movilización de los triglicéridos; así como el depósito inguinal presenta mayor expresión de los genes implicados en la oxidación de los ácidos grasos, lo cual implica una mayor capacidad oxidativa (Palou et al., 2009a).

2.2.1.1.- Lipólisis

En el tejido adiposo los ácidos grasos almacenados se encuentran en forma de triglicéridos. En periodos de elevada demanda energética, como el ayuno o una larga exposición al frío, las reservas de grasa almacenada hidrolizan los triglicéridos y liberan los ácidos grasos no esterificados (**NEFA**, *Non-esterified fatty acid*) al torrente circulatorio. En el proceso de movilización de los ácidos grasos almacenados en forma de triglicéridos, están implicadas dos enzimas lipolíticas clave, la triglicérido lipasa adiposa (**ATGL**, *Adipose triglyceride lipase*) y la lipasa sensible a hormonas (**HSL**, *hormone-sensitive lipase*) (Zechner et al., 2009; Zimmermann et al., 2004).

La ATGL cataliza la primera fase de la hidrólisis de los triglicéridos, liberando un ácido graso y formando diacilglicerol, sustrato de la HSL. La HSL hidroliza el diacilglicerol a monoacilglicerol liberando otro ácido graso, y finalmente éste es hidrolizado por la monoacilglicerol lipasa, formando glicerol y otro ácido graso (Revisado en (Lehninger et al., 2000; Zechner et al., 2009)). Ambas enzimas están reguladas por la acción de la insulina, estudios *in vitro* demuestran cómo la presencia de insulina disminuye la expresión del enzima lipolítico ATGL (Kershaw et al., 2006). Por ello, bajo un balance energético negativo como el que se da en condiciones de ayuno, la concentración de insulina y leptina circulantes disminuye, lo que está correlacionado con un aumento de la expresión de *Atgl* (Caimari et al., 2008; Oliver et al., 2012). Nuestro laboratorio ha contribuido al conocimiento de la regulación nutricional de la lipólisis, habiéndose descrito que la expresión del gen *Atgl* está aumentada en condiciones de ayuno e inhibida en la realimentación (Oliver et al., 2012; Palou et al., 2008); esta regulación nutricional se pierde durante el envejecimiento, lo que contribuye a una menor movilización de los lípidos almacenados (Caimari et al., 2008).

Por tanto, los enzimas ATGL y HSL catalizan de manera coordinada los triglicéridos almacenados en el tejido adiposo. Debido a sus implicaciones en la regulación de la homeostasis energética, perturbaciones en la lipólisis están ligadas a variaciones en las concentraciones de los ácidos grasos circulantes, que pueden contribuir en la patogenia de la obesidad y la resistencia a la insulina (Hsu et al., 2007). En animales genéticamente obesos, la expresión de *Atgl* se ve inhibida, lo que

promueve una menor movilización de los triglicéridos almacenados, sin embargo estudios de nuestro laboratorio ponen de manifiesto que la exposición al frío mejora la expresión de la *Atgl* en estos animales (Caimari et al., 2012). Por otra parte, en el estado obeso, los mecanismos implicados en el control de la homeostasis energética están dañados y se observa una pérdida de respuesta al ayuno en la expresión génica de la *Atgl* (Caimari et al., 2012).

2.2.1.2.- Lipogénesis y adipogénesis

El proceso de lipogénesis, que tiene lugar en el hígado y tejido adiposo, abarca el proceso de síntesis de ácidos grasos y la síntesis de triglicéridos. El primer paso de la síntesis *de novo* es llevado a cabo por el enzima acetil coenzima A carboxilasa 1 (**ACC1**, *Acetyl coenzyme A carboxylase 1*), que cataliza la carboxilación del Acetil-CoA a Malonil-CoA, necesario para la síntesis de ácidos grasos. Seguidamente, la ácido grasos sintasa (**FASN**, *Fatty acid synthase*) es la encargada de unir moléculas de Acetil-CoA mediante condensaciones descarboxilativas (Nguyen et al., 2008). Ambas enzimas están reguladas tanto por los niveles de insulina y glucagón circulantes, como por el estado nutricional. Por ejemplo, en condiciones de ayuno, ante bajas concentraciones de insulina, la expresión de del gen *Fasn* disminuye (Palou et al., 2008).

La regulación de genes lipogénicos por la insulina es mediada por la proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides (**SREBP**, *Sterol regulatory element binding protein*). Este factor de transcripción está muy regulado por las concentraciones de insulina circulantes, bajas concentraciones de insulina inhiben la expresión y la acción del factor de transcripción SREBP disminuyendo la expresión de los genes que regula (Kersten, 2001; Nguyen et al., 2008; Palou et al., 2009a; Palou et al., 2008). Existen tres tipos: SREBP2, SREBP1a y SREBP1c, de los cuales el SREBP1c es la forma más relevante fisiológicamente. El factor de transcripción SREBP1 está regulado por los niveles circulantes de insulina y glucosa, y regula a su vez la expresión de genes implicados en la lipogénesis (los activa), como la *Fasn* o la *Acc1*, mientras que el factor de transcripción SREBP2 está regulado por las concentraciones de colesterol celular y regula la expresión de genes implicados en el metabolismo del colesterol (Horton and Shimomura, 1999; Kersten, 2001).

Aunque el SREBP es uno de los factores de transcripción implicados en la regulación de la lipogénesis, es sobretodo importante en el hígado, mientras que en el tejido adiposo el factor más importante implicado en la regulación de la lipogénesis y adipogénesis (proceso de diferenciación de pre-adipocitos a adipocitos maduros) es el factor receptor activado por el proliferador perioxosomal γ (**PPAR γ** , *Peroxisome proliferator activated receptor γ*) (Evans et al., 2004; Kersten, 2001). El PPAR γ es un receptor nuclear de hormonas de la familia de los **PPARs**. Esta familia de receptores nucleares incluye tres isoformas, alfa (PPAR α), beta (PPAR β) y gamma (PPAR γ). El PPAR α y PPAR γ son los más abundantes en el hígado y en el tejido adiposo, respectivamente, y el PPAR β se expresa de manera abundante por todo el cuerpo menos en el hígado. Mientras que el PPAR γ promueve la lipogénesis y el almacenamiento de lípidos en los adipocitos y en los hepatocitos, así como promueve la adipogénesis y la producción de adipocinas en los adipocitos, el PPAR α promueve la oxidación de ácidos grasos, en el hígado y en el músculo, y el PPAR β aumenta la oxidación de ácidos grasos y la termogénesis adaptativa en el músculo y tejido adiposo (Revisado en (Evans et al., 2004)). Concretamente, el PPAR γ promueve la expresión

de genes que codifican para proteínas del almacenamiento de lípidos y de la lipogénesis como la lipoproteína lipasa, el transportador de ácidos grasos 2 (FATP2, *Fatty acid transporter protein 2*), el factor de transcripción SREBP1 y el esteroil coenzima A desaturasa 1 (SCD-1, *Stearoyl coenzyme A desaturase 1*) (Revisado en (Cho et al., 2004; Evans et al., 2004; Laplante and Sabatini, 2009)). Por ello, los factores de transcripción SREBP1 y PPAR γ son dianas terapéuticas de enfermedades como la obesidad e hipetrigliceridemia (Evans et al., 2004; Kersten, 2001).

La lipogénesis está muy regulada por componentes nutricionales como ácidos grasos poliinsaturados o ácido retinoico (Bonet et al., 2012; Kersten, 2001). Por ejemplo, los ácidos grasos poliinsaturados (docosahexanoico y eicosapentanoico) inhiben la lipogénesis, disminuyendo la expresión y activación del factor de transcripción *Srebp1c*, así como de la *Fasn* y *Scd-1*. Además, aumenta la lipólisis, aumentando la expresión de genes implicados en esta ruta metabólica (*Ppara*) (Chen et al., 2012; Lottenberg et al., 2012). La correlación entre el tratamiento con ácido retinoico y una disminución del peso corporal y la adiposidad está bien establecida (Berry and Noy, 2009; Bonet et al., 2000; Puigserver et al., 1996; Ribot et al., 2001; Ström et al., 2009). Se ha estudiado en ratones, como el tratamiento con ácido retinoico en el tejido adiposo disminuye la lipogénesis y estimula la lipólisis (Berry and Noy, 2009; Mercader et al., 2006). Del mismo modo, en el hígado, otro estudio realizado en ratones, demuestra como el tratamiento con ácido retinoico todo-trans, no tan solo regula la lipogénesis, disminuyendo la expresión de *Srebp1c* y *Fasn*, sino que también promueve la lipólisis, aumentando la expresión de genes como *Ppara* y *Ucp2* (Amengual et al., 2010).

2.2.2.- El tejido adiposo marrón (TAM) y la termogénesis adaptativa

En los mamíferos el TAM, que tiene una función opuesta al TAB, está dotado de una gran capacidad oxidativa, y es el órgano clave en la disipación de energía en forma de calor en el proceso que se conoce como termogénesis adaptativa (Bonet et al., 2012). El mecanismo mejor conocido de regulación de este gasto energético es el que viene mediado por la actividad de la proteína desacoplante 1 o termogenina (UCP1) (Cannon and Nedergaard, 2004; Ricquier, 2005).

El crecimiento y la actividad del TAM están regulados por el SNS, de manera que se induce bajo determinadas condiciones fisiológicas que activan el SNS, promoviendo la liberación de norepinefrina, como la exposición al frío o la ingesta crónica de dietas hipercalóricas (Palou et al., 1998). La norepinefrina tiene un papel fundamental en la activación de los adipocitos marrones promoviendo la activación de la UCP1, la diferenciación celular, aumentando la síntesis de UCP1, y estimulando su división. Los efectos de la norepinefrina están mediados por el receptor adrenérgico beta-3, expresado principalmente en adipocitos blancos y marrones. Esta estimulación adrenérgica activa la lipólisis de los triglicéridos almacenados en los adipocitos y los ácidos grasos liberados entran en la mitocondria, son beta-oxidados y ponen en marcha el ciclo de Krebs y la cadena respiratoria, generándose un gradiente de protones en el espacio intermembrana. En los adipocitos marrones este gradiente se disipa gracias a la presencia de UCP1. Esta proteína actúa como un canal de protones, situado en la membrana mitocondrial interna que reintroduce los protones producto de la oxidación dentro de la mitocondria, compitiendo así con la ATP sintasa, de manera que al estar activa la UCP1 disminuye la síntesis de ATP y la energía se disipa en forma de calor (Figura 3). La activación del TAM supone pues una respuesta

metabólica en la que se aumenta la producción de calor, lo cual permite una adaptación al frío pero, además, puede incrementar significativamente el gasto energético movilizando depósitos grasos presentes en los propios adipocitos marrones. Pero los adipocitos marrones activos también pueden usar ácidos grasos circulantes procedentes de la movilización del TAB como sustrato termogénico (Cannon and Nedergaard, 2004; Palou et al., 1998). Por otra parte, la glucosa es un combustible importante para el TAM, probablemente no como sustrato termogénico directo sino como fuente de carbono para la síntesis de ácidos grasos para ser oxidados; o para una rápida recuperación de los niveles de ATP por glucólisis (Cannon and Nedergaard, 2004).

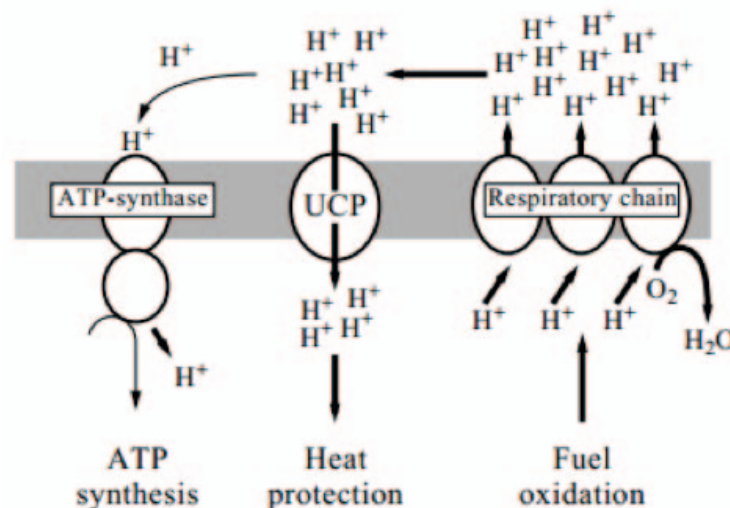


Figura 3. Imagen de los tres elementos implicados en la formación o disipación de energía en la membrana interna de la mitocondria de los adipocitos marrones. A la derecha se encuentra la cadena respiratoria encargada de la oxidación de combustible, bombeando protones hacia el exterior de la mitocondria, y estos son reintroducidos a su interior mediante la ATP sintetasa o UCP. En este último caso, la energía almacenada en el gradiente de protones se disipa en forma de calor (termogénesis) en lugar de ser conservada en forma de ATP. Imagen de Palou A., et al. 1998 (Palou et al., 1998).

En definitiva, el TAM activo es un importante lugar de ruptura de lípidos y de captación de glucosa, de tal manera que su activación y la de la UCP1 es especialmente interesante para combatir el problema no tan solo de la obesidad sino también de la diabetes. Vemos pues, que se trata de un tejido adiposo de utilidad desde el punto de vista terapéutico.

A parte de la proteína UCP1, hay otras proteínas termogénicas, como la UCP2 y la UCP3, sin embargo estudios realizados en ratones ponen de manifiesto que ni la UCP2 ni UCP3 pueden substituir la actividad termogénica de la UCP1 inducida por norepinefrina (Cannon and Nedergaard, 2004; Matthias et al., 2000). La UCP2 tiene una función análoga a la UCP1 pero no responde ni al frío ni a agonistas del receptor adrenérgico beta-3 (Fleury et al., 1997). La UCP3, que se expresa de manera importante en el músculo, también se ve regulada con la sobrealimentación; hay estudios que presentan una correlación positiva entre la sobreexpresión de la UCP1 en el TAM y la UCP3 en el músculo, asociado con el sobrepeso (Rodríguez and Palou, 2004).

2.2.2.1.- Activación del TAM como diana para el tratamiento de la obesidad

En roedores, la termogénesis adaptativa es una parte relevante del gasto energético, con una importancia crítica en el balance energético y en el mantenimiento del peso corporal (Cannon and Nedergaard, 2004; Palou et al., 1998). Por tanto, alteraciones en la expresión de este gen así como alteraciones en la proteína a la que se traduce, pueden suponer alteraciones en el balance energético, tales como el desarrollo de la obesidad (Kozak and Koza, 1999). Igualmente, tratamientos que induzcan una sobreexpresión de este gen están asociados a una protección frente al desarrollo de obesidad genética o inducida por la dieta (Kozak and Koza, 1999).

Sin embargo, el interés en este órgano estaba disminuido porque, a diferencia de lo que ocurre en roedores, durante años se asumió que los humanos adultos estaban prácticamente desprovistos de TAM, y que, por tanto, este tejido no jugaba un papel importante en el control del peso corporal en nuestra especie (Cunningham et al., 1985). En humanos, el TAM, localizado en la región interscapular, está presente y activo en recién nacidos, siendo el responsable de mantener la temperatura corporal sin escalofríos. En el periodo post natal este tejido se pierde rápidamente y se pensaba que en la edad adulta tan solo quedan restos vestigiales de TAM. Recientemente, y gracias a datos obtenidos por tomografía de emisión por positrones o PET (técnica utilizada para la localización de tumores), se ha descrito que esto no es así, sino que los humanos adultos mantienen TAM activo, aunque no tan definido anatómicamente como en roedores, apareciendo de modo disperso en áreas discretas, localizadas principalmente en la región cervical, supraclavicular, axilar y paravertebral (Nedergaard et al., 2007). Los estudios existentes indican a que el tejido adiposo marrón está presente, expresa UCP1 y puede ser activado en la mayoría de los humanos y que, además, su activación correlaciona inversamente con el índice de masa corporal, el contenido de grasa total y la diabetes, ya que el utiliza para su funcionamiento grasa (principalmente) pero también glucosa (Celi, 2009).

Gracias a estos conocimientos, el TAM y su potencial termogénico es actualmente una diana reconocida a nivel internacional para combatir el sobrepeso, la obesidad y la diabetes tipo 2. Precisamente, el proyecto europeo DIABAT “*Recruitment and activation of brown adipocytes as preventing and curative therapy for type 2 diabetes*” (no. HEALTH-F2-2011-278373), en el que participa nuestro grupo de investigación, tiene como objetivo la activación de la termogénesis en el TAM para prevenir y tratar la diabetes tipo 2. Aparte de los activadores más conocidos, como la exposición al frío y de tratamientos farmacológicos (como por ejemplo agonistas de receptores adrenérgicos beta-3), se está también analizando el efecto estimulador del TAM de la dieta y componentes nutricionales.

2.2.2.2.- Remodelación del tejido adiposo blanco a marrón: marronización o *browning*

Recientemente se ha revelado, principalmente en roedores, que frente a determinados estímulos puede producirse una remodelación del tejido adiposo blanco en marrón, proceso conocido como marronización o *browning* (Loncar, 1991). Este proceso consiste en la aparición de adipocitos similares a los adipocitos marrones en depósitos de TAB en respuesta a estímulos como exposición al frío, tratamiento con fármacos o tratamientos dietarios (Bonet et al., 2013; Giralta and Villarroya, 2013). Los adipocitos marrones presentes en el TAB reciben el nombre de *brite* (de *brown in white*) o *beige*. Estas células tienen características similares a los adipocitos marrones,

como su capacidad termogénica, por lo que podrían contribuir al gasto energético y al mantenimiento del peso corporal; se forman en el periodo post-natal y su formación se ve inducida por la activación del SNS, vía receptor adrenérgico beta-3 (Revisado en (Barneda et al., 2013; Cinti et al., 2002; Cousin et al., 1992; Giralt and Villarroya, 2013; Petrovic et al., 2010; Wu et al., 2012; Xue et al., 2005). También en humanos se han encontrado islas de tejido adiposo marrón dentro de depósitos de grasa blanca, y adipocitos con características de adipocitos marrones que expresan ARNm de UCP1 (Garruti and Ricquier, 1992; Oberkofler et al., 1997) y que puede ser inducida por tratamientos farmacológicos en cultivo (Champigny and Ricquier, 1996).

La posibilidad de aumentar la cantidad de adipocitos marrones funcionales, especialmente aquellos presentes en los abundantes depósitos de grasa blanca aparece como una interesante herramienta o posibilidad terapéutica para combatir (prevenir o tratar) la obesidad y problemas relacionados. De hecho, se cree que la remodelación del tejido adiposo blanco a marrón puede conferir protección frente a la obesidad en numerosos modelos experimentales (Bonet et al., 2013).

- Origen y marcadores moleculares de los adipocitos *brite*

Actualmente existe una controversia sobre el origen de los adipocitos *brite*, pero con independencia de su origen, estos adipocitos y la estimulación de la remodelación del tejido adiposo blanco a marrón (marronización) tienen un claro interés terapéutico. Existe un gran interés en identificar marcadores específicos de adipocitos marrones/*brite* para, entre otras cosas, contribuir al esclarecimiento de los diferentes linajes celulares. Estos marcadores también son de utilidad para poder estudiar el efecto marronizador de tratamientos experimentales, farmacológicos o dietarios.

Desde una perspectiva celular, los adipocitos se desarrollan a partir de los preadipocitos, que a su vez se derivan de células precursoras (Cawthorn et al., 2012). Aunque durante mucho tiempo se ha asumido que los adipocitos marrones y blancos tenían un precursor común debido a su gran similitud, se ha visto como los adipocitos marrones derivan de la misma *stem cell Myf5⁺* que los miocitos (células musculares) y siguen un patrón de diferenciación diferente al de los adipocitos blancos. Sin embargo, los adipocitos blancos derivan de una *stem cell Myf5⁻*. El responsable de la regulación de la formación del precursor de adipocitos marrones en lugar de mioblasto, es el cofactor transcripcional PRD1-BF1-RIZ1 homólogo al dominio que contiene proteína 16 (*Prdm16, PRD1-BF1-RIZ1 homologous domain-containing protein-16*) (Seale et al., 2007). La activación de *Prdm16* promueve la formación del precursor de adipocitos marrones, siendo un determinante clave para la formación del tejido adiposo marrón (Petrovic et al., 2010; Rosen and Spiegelman, 2014; Seale et al., 2007). Sin embargo, los adipocitos *brite*, a pesar de tener actividad termogénica mediada por la UCP1, al igual que los adipocitos marrones, no provienen de las *Myf5⁺*, siendo ésta una de las mayores evidencias para postular que se trata de otro tipo celular (Rosen and Spiegelman, 2014; Seale et al., 2008). Pero a pesar de saber que provienen de distinta célula precursora hay mucha controversia sobre el origen de los adipocitos *brite*:

i. Una de las teorías sobre la formación de estos adipocitos se basa en la transdiferenciación de adipocitos blancos maduros, ya existentes, a adipocitos *brite* mediante estímulos del SNS mediados por los receptores adrenérgicos beta-3. Parece ser que los mecanismos de proliferación celular no están implicados en este proceso, ya que no hay cambio en el contenido de ADN. Además, mediante microscopia electrónica e inmunoreactividad de UCP1 se ha visto como estas células presentan

características intermedias entre los adipocitos blancos y marrones. Por ejemplo, aparecen adipocitos con diferentes subpoblaciones de mitocondrias, desde mitocondrias típicas de adipocitos blancos hasta mitocondrias típicas de adipocitos marrones, pasando por una subpoblación de mitocondrias intermedias, que pueden encontrarse en adipocitos UCP1 positivos con una vacuola lipídica grande, indicando una remodelación de los adipocitos (Barbatelli et al., 2010). Las vacuolas lipídicas también juegan un papel importante en la remodelación de los adipocitos. Barneda y colaboradores muestran como durante un larga exposición al frío la proteína inductora de la muerte celular DFFA-como efector A (**CIDE-A**, *Cell death-inducing DFFA-like effector a*), usado como marcador de marronización, aumenta su expresión, indicando una remodelación de las gotículas lipídicas para formar múltiples vacuolas, a partir de los ácidos grasos sintetizados con las elevadas concentraciones de glicerol producto de la lipólisis inducida por la exposición al frío (Barneda et al., 2013).

ii. Otra teoría sobre el origen de estos adipocitos se basa en la existencia de unas células precursoras diferentes a las de los adipocitos blancos y marrones. Ante una estimulación crónica adrenérgica-beta o una estimulación crónica mediante un agonista de PPAR γ , se induce la formación de células *brite* en depósitos de tejido adiposo blanco; sin embargo, no todos los adipocitos blancos son susceptibles a estos estímulos sugiriendo la presencia de otra población celular más sensible (Petrovic et al., 2010). Además, la exposición al frío u otro estímulo adrenérgico aumenta la adipogénesis (aumenta la expresión del gen adipogénico *Ppar γ*), lo que también podría explicar que los adipocitos *brite* deriven de una célula precursora diferente (Petrovic et al., 2010; Wang et al., 2013). Estos adipocitos presentan características de los adipocitos blancos y de los adipocitos marrones, aunque también se ha descrito que presentan un patrón de expresión génica diferencial (Petrovic et al., 2010; Wu et al., 2012).

Patrón de expresión génica de las células brite compartido con adipocitos blancos y marrones

Los adipocitos blancos y *brite* presentan niveles de expresión similares de marcadores de adipocitos, como *adiponectina*, *Ppar γ* y aP2, proteína transportadora de ácidos grasos que se expresa principalmente en los adipocitos (Wu et al., 2012). Las células *brite* también presentan otros marcadores compartidos con tejido adiposo blanco, como el gen que codifica para Homeobox C9 (***Hoxc9***), que aumenta en estas células ante estímulos adrenérgicos (Petrovic et al., 2010). Además, ambos tipos celulares presentan una expresión basal de marcadores de adipocitos marrones, como ***Ucp1***, ***Prdm16***, ***Cidea***, factor de crecimiento de fibroblastos 21 (***Fgf21***, *Fibroblast growth factor*) y coactivador-1 del receptor de peroxisoma activado por proliferador (***Pgc1 α*** , *Peroxisome proliferator-activated receptor c coactivator 1 alpha*); cuya expresión es muy baja comparada con los adipocitos marrones (Petrovic et al., 2010; Wu et al., 2012). Sin embargo ante una estimulación adrenérgica aumenta la expresión de estos marcadores característicos de adipocitos marrones en los adipocitos *brite*. Así, por ejemplo, ante un estímulo de frío la expresión de *Ucp1* en células *brite* aumenta, llegando a presentar niveles similares a los adipocitos marrones, y también aumentan los niveles de expresión de *Fgf21* (Revisado en (Fisher et al., 2012; Wu et al., 2012)). No obstante, ante este tipo de estímulos, los adipocitos marrones no siguen el mismo patrón que las células *brite*; estudios previos muestran como ante un estímulo de frío la expresión de *Cidea* disminuye en los adipocitos marrones y la expresión de *Prdm16* no se ve alterada (Revisado en (Petrovic et al., 2010; Shimizu and Yokotani, 2009)).

En el tejido adiposo blanco la hormona FGF21 regula la proteína PGC1 α , aumentando sus niveles independientemente de su expresión, regulando el proceso de marronización (Fisher et al., 2012)

Además de los mencionados anteriormente hay otros marcadores específicos de los adipocitos marrones como son: factor 3 de las pre-células B (*Ebf3*, *early B-cell factor 3*), factor de transcripción T-box 15 (*Tbx15*, *T-box 15*), proteína EVA1 (*Eva1*, *Protein EVA1*), proteína F-BOX 31 (*Fbxo31*, *F-box protein 31*).

Patrón de expresión génica característico de las células brite

Los adipocitos *brite* también presentan un perfil de expresión génica característico, distinto a los adipocitos blancos y marrones, que permite diferenciarlos. Los genes expresados de manera selectiva en estos adipocitos incluyen factores de transcripción del desarrollo, componentes del metabolismo lipídico, genes de las vías del sistema inmune y de la respuesta inflamatoria. Algunos de los más característicos son:

- El gen que codifica para el factor de transcripción T-box 1 (*Tbx1*, *T-box transcription factor*). Este factor de transcripción tiene un papel importante en la formación de los tejidos y órganos durante el desarrollo embrionario, su expresión de este gen es característica de los adipocitos *brite* (Wu et al., 2012).

- Algunos autores definen el gen que codifica para la proteína transportadora de ácidos grasos SLC27A1 (*Slc27a1*, *Solute Carrier Family 27 (Fatty Acid Transporter), Member 1*) como un marcador específico de las células *brite* (Wu et al., 2012). Este gen codifica para una proteína de la membrana plasmática de los adipocitos marrones, encargada de entrar los ácidos grasos al interior de los adipocitos para su posterior oxidación (Wu et al., 2006).

- El gen que codifica para las moléculas marcadoras de la superficie celular que reconocen ciertos anticuerpos, **CD40** y **CD137**, son considerados marcadores específicos de células *brite*. Análisis inmunohistoquímicos en células del tejido adiposo inguinal muestran como los adipocitos *brite* UCP1 positivos también son CD137 positivos, sin embargo los adipocitos marrones UCP1 positivos no lo son (Wu et al., 2012).

- El gen que codifica para la proteína transmembrana 26 (*Tmem26*, *Transmembrane Protein 26*), también se considera un marcador específico de las células *brite*. De la misma manera que el marcador CD137, los adipocitos *brite* UCP1 positivos también son TMEM26 positivos, sin embargo los adipocitos marrones UCP1 positivos no lo son (Wu et al., 2012).

En resumen estas células se activan bajo ciertos estímulos presentando unas características morfológicas y un patrón de expresión génica diferencial. Cuando el estímulo cesa las células *brite* inactivas adoptan unas características morfológicas similares a los adipocitos blancos, convirtiéndose en unas células almacenadoras de energía en forma de grasa cesando su actividad termogénica (Rosen and Spiegelman, 2014).

Como se ha expuesto anteriormente, el corregulador transcripcional *Prdm16* controla el desarrollo de adipocitos marrones en el TAM. Aunque hasta el momento este gen solo se expresaba en el TAM, recientemente se ha observado que algunos depósitos blancos, sobretodo subcutáneos, presentan expresión basal de *Prdm16*,

aunque menor a la del TAM (Seale et al., 2011), sugiriendo que este factor transcripcional es crítico en la regulación de la formación de *brite* en los depósitos subcutáneos de TAB. Por ello, se ha descrito que la presencia de células *brite*, en animales expuestos a estímulos como el frío, es mayor en los depósitos adiposos subcutáneos, que en los viscerales (Cohen et al., 2014; Seale et al., 2011).

De manera interesante, el perfil de expresión génica en TAM en humanos es muy similar al de los adipocitos *brite* en roedores (Lee et al., 2013b; Sharp et al., 2012; Wu et al., 2012). Esto indicaría que los depósitos de TAM en humanos estarían compuestos principalmente por adipocitos *brite*, y no tanto por adipocitos marrones clásicos, por lo que el estudio del proceso de inducción de marronización sería especialmente interesante. Sea como sea, la presencia e inducción del TAM o de la remodelación del tejido adiposo blanco a marrón en humanos abre nuevas vías para el estudio de terapias para la obesidad. Moléculas como la irisina (Wu et al., 2012), hormonas polipeptídicas como el FGF21 (Fisher et al., 2012), o componentes alimenticios como la capsaicina (Saito, 2013) podrían ser útiles para inducir el TAM en humanos, ya que aumentan la actividad de las células *brite*. Sin embargo, hoy en día todavía no se conoce relevancia fisiológica de la marronización/activación del TAM en humanos, por lo que son necesarios más estudios.

2.2.2.3.- Dificultades en el estudio de la marronización

El estudio de la remodelación del abundante TAB a TAM, capaz de incrementar el gasto energético es muy interesante desde el punto de vista de la prevención y tratamiento de la obesidad. Sin embargo, existen una serie de obstáculos a la hora de realizar estudios en humanos o extrapolables a humanos.

Por una parte, los estudios directos en humanos son complicados porque requieren del uso de biopsias de difícil obtención, o bien el uso de técnicas de estudio que implican el uso de isótopos radiactivos (tomografía por emisión de positrones o PET). Por otra parte, la mayoría de estudios con animales se realizan en roedores que, a diferencia de lo que ocurre en humanos, presentan gran cantidad de TAM en estado adulto y con una distribución muy diferente. Sería, por tanto, interesante utilizar modelos animales más apropiados. En nuestro grupo de investigación se han realizado estudios de los efectos de la exposición al frío en hurones, especie que presenta una distribución y fisiología del tejido adiposo más parecida a humanos. Estos estudios concluyeron que los hurones expuestos a frío presentaban más adipocitos marrones y una mayor expresión de UCP1 que los hurones estabulados en termoneutralidad (Fuster et al., 2009).

Dada las características tan singulares que presentan las PBMC, serían muy buenas candidatas a ser utilizadas para realizar estudios de marronización con extrapolabilidad a humanos. Sin embargo, el análisis de la utilidad de las PBMC en el campo de estudio de la marronización está por explorar y es parte de nuestros objetivos dentro del proyecto europeo DIABAT.

2.3.- El hígado y su función en la homeostasis energética

El hígado es uno de los órganos más importantes en el mantenimiento del balance energético, participa tanto en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa, como en el metabolismo lipídico.

2.3.1.- El hígado y mantenimiento de la homeostasis de la glucosa

El hígado tiene un papel fundamental en el mantenimiento de los niveles óptimos de glucosa en sangre, ya que lleva a cabo procesos como la glucogenogénesis, gluconeogénesis y glucogenolisis (Brock and Dorman, 2007; Lehninger et al., 2000; Sherwin, 1980). En el estado postprandial, cuando los niveles de glucosa circulantes son elevados, aumenta el nivel de insulina circulante lo que favorece la captación de glucosa por los tejidos dependientes de insulina (músculo, tejido adiposo), así como por los tejidos no dependientes de insulina (cerebro). Por su parte, el hígado es el encargado de captar los excedentes de glucosa circulante y almacenarlos en forma de glucógeno (glucogenogénesis). Sin embargo, bajo condiciones de ayuno, desciende la concentración de insulina circulante, reduciéndose la captación de glucosa por los tejidos dependientes de insulina, quedando la glucosa circulante disponible para el cerebro y la médula adrenal. En estas condiciones, el hígado pone en marcha dos mecanismos para la liberación de glucosa al torrente circulatorio: síntesis *De Novo* de glucosa (gluconeogénesis) y formación de glucosa a partir del glucógeno (glucogenolisis) (Brock and Dorman, 2007; Lehninger et al., 2000; Sherwin, 1980).

2.3.2.- El hígado y el metabolismo lipídico

El hígado tiene un papel activo en el metabolismo lipídico, participando tanto en la lipólisis y oxidación de los ácidos grasos como en la síntesis de ácidos grasos, dependiendo de las condiciones energéticas del organismo. Como parte del metabolismo lipídico también se encarga de la síntesis y secreción de lipoproteínas.

2.3.2.1.- Lipólisis y oxidación de ácidos grasos

El proceso de hidrólisis de triglicéridos se lleva a cabo sobre todo en el tejido adiposo, pero en determinadas condiciones fisiológicas el hígado también contribuye en este proceso (Reid et al., 2008). Mediante la lipólisis los triglicéridos se hidrolizan a ácidos grasos y glicerol (ver apartado **2.2.- El tejido adiposo y su función en la homeostasis energética**). En primer lugar, los triglicéridos se hidrolizan a diacilgliceroles por acción de la ATGL, produciendo el sustrato de la HSL, que cataliza la hidrólisis de los diacilgliceroles a monoacilgliceroles. El correcto funcionamiento de estas enzimas tanto en el tejido adiposo como en el hígado es fundamental para la liberación de ácidos grasos y su posterior oxidación y obtención de energía (Revisado en (Lehninger et al., 2000; Nguyen et al., 2008; Zimmermann et al., 2004)).

El hígado es extremadamente activo en la oxidación de los ácidos grasos para la producción de energía. Ante determinadas condiciones fisiológicas, como periodos de escasez energética como el ayuno o bien ante dietas con alto contenido en grasas y bajo contenido en carbohidratos, aumentan los procesos de oxidación de los NEFA. La β -oxidación de los ácidos grasos tiene lugar principalmente en la mitocondria, si bien

los ácidos grasos de cadena larga pueden oxidarse también en los peroxisomas (Nguyen et al., 2008). Tanto los ácidos grasos de la dieta como los de síntesis endógena, son oxidados en la mitocondria. Los ácidos grasos de cadena larga entran en la mitocondria a través de la lanzadera de carnitina, mecanismo regulado por la carnitina palmitoil transferasa 1 (**CPT1**, *Carnitine Palmitoyltransferase-1*), enzima regulador clave de la β -oxidación. Se trata de una proteína integral de la membrana externa mitocondrial, que cataliza la formación de moléculas de acil-carnitina (que son transportadas a través de la membrana). A continuación, una proteína transportadora translocasa, situada en la membrana mitocondrial interna, transfiere la acil-carnitina a la matriz mitocondrial y, paralelamente, la **CPT2** (**CPT2**, *Carnitine Palmitoyltransferase-2*) une una molécula de CoA de la matriz al ácido graso, regenerando así el acil-CoA. La carnitina vuelve al espacio intermembrana mediante la proteína transportadora y reacciona con otro acil-CoA, repitiéndose este ciclo (Kerner and Hoppel, 2000; Lee et al., 2011). Dentro de la mitocondria los ácidos grasos son oxidados para obtener acetil-CoA, el cual entra en el *ciclo de Krebs* para la obtención de energía en forma de ATP. La actividad de la CPT1 está regulada por la presencia de malonil-CoA, ya que elevadas concentraciones de malonil-CoA inhiben la actividad de la CPT1, reduciendo así la β -oxidación. El malonil-CoA es el producto del primer paso de la lipogénesis (síntesis de ácidos grasos *De Novo*) catalizado por la Acetil-CoA carboxilasa, enzima regulada por las concentraciones de insulina (Brindle et al., 1985). En condiciones de un bajo balance energético, con bajas concentraciones de insulina circulante, la acetil-CoA carboxilasa esta inhibida por lo que se reduce la formación de malonil-CoA y aumenta la actividad de la CPT1, aumentando así la β -oxidación y la obtención de energía en forma de ATP (Nguyen et al., 2008). Además, otros estudios demuestran que las bajas concentraciones de insulina en condiciones de ayuno también aumentan la expresión del gen *Cpt1* (Palou et al., 2008).

Ante condiciones fisiológicas de ayuno prolongado, el hígado aumenta la captación de los ácidos grasos y el catabolismo de los mismos, produciendo grandes cantidades de cuerpos cetónicos, acetato y β -hidroxibutirato, en el proceso de cetogénesis. Este proceso de cetogénesis se activa ante elevadas concentraciones de acetil-CoA, cuando el producto de la β -oxidación es mayor a la capacidad del *ciclo de Krebs*. El Acetil-CoA se usa para la síntesis de cuerpos cetónicos por la vía del β -hidroxi- β -metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) sintasa (Nguyen et al., 2008). En periodos de ayuno, en un periodo de déficit energético, tanto en el hígado como en el tejido adiposo aumentan la expresión del FGF21. Esta proteína en el hígado se conoce como un estimulador de la cetogénesis mientras que en el tejido adiposo un estimulador de la lipólisis (Lundâsen et al., 2007; Palou et al., 2008).

2.3.2.2.- Síntesis de ácidos grasos

La síntesis *De Novo* de ácidos grasos es una ruta metabólica clave en la homeostasis energética. Está controlada por las condiciones hormonales y nutricionales. Por ejemplo, dietas ricas en carbohidratos aumentan la lipogénesis (Schwarz et al., 2003), mientras que un balance energético negativo (como condiciones de ayuno) la inhiben. Por tanto, la regulación de la lipogénesis depende tanto de las concentraciones de insulina circulante como de la sensibilidad a la insulina de los tejidos. Los dos tejidos más importantes en la síntesis de ácidos grasos son el hígado y el tejido adiposo. En el tejido adiposo, la síntesis de los ácidos grasos contribuye a la deposición *in situ* y al almacenaje (ver apartado **2.2.1.- El tejido adiposo y el metabolismo lipídico**). El hígado sintetiza ácidos grasos, almacenando

parte de éstos y exportando parte de ellos a través de las lipoproteínas (VLDL) a otros tejidos para proporcionar energía o formar parte de su estructura (membranas) (Nguyen et al., 2008).

El hígado también se encarga de captar los NEFA, producto de la hidrólisis de lípidos (catalizada por las lipasas). Éstos entran en los hepatocitos a partir de transportadores o receptores de membrana o bien por difusión pasiva. Dentro del hígado los NEFA son utilizados para la obtención de energía mediante la oxidación, para la síntesis de ácidos grasos y para la formación de lípidos complejos (Nguyen et al., 2008).

2.4.- Adaptaciones metabólicas al ayuno y realimentación

Como ya se ha expuesto en apartados anteriores, el mantenimiento de la homeostasis energética es muy importante para la supervivencia de los organismos, por ello, en condiciones de ayuno se ponen en marcha ciertos mecanismos que mantienen estable la energía del organismo. Por ejemplo, en condiciones de alimentación, los animales utilizan preferentemente los carbohidratos como fuente de energía y el exceso de carbohidratos se almacenan en forma de grasa en el TAB; no obstante, cuando la disponibilidad de la glucosa disminuye los animales dejan de oxidar los carbohidratos para la obtención de ATP y pasan a utilizar la grasa almacenada.

En mamíferos, la sensación de saciedad y de apetito están reguladas por un sistema complejo de señalización a nivel del SNC y sistema nervioso periférico. Para el control de las condiciones de alimentación (ayuno y realimentación) el núcleo arcuato, presente en el hipotálamo, es muy importante. De manera general, ante condiciones de ayuno, baja la glucemia, así como los indicadores de adiposidad (insulina y leptina) y aumenta la ghrelina (hormona gástrica orexigénica), y se produce una activación de la expresión de los péptidos orexigénicos (*Npy* y *Agrp*) que inducen la ingesta y reducen el gasto energético, mientras que, con periodos cortos de ayuno, no se ve afectada la expresión de los péptidos anorexigénicos (*Pomc* y *Cart*) (Palou et al., 2009b; Yu and Kim, 2012). Esta regulación selectiva de los péptidos hipotalámicos sugiere que las neuronas NPY y AgRP son más sensibles a los cambios hormonales y metabólicos asociados al ayuno, siendo los primeros respondedores al ayuno, con una inducción transitoria de la expresión de *Npy* (siendo significativa a las 4 horas) y una inducción sostenida de la expresión de *Agrp*.

Los cambios hormonales y metabólicos producidos en condiciones de ayuno, como los bajos niveles de glucosa e insulina, inducen un aumento de la lipólisis de los triglicéridos almacenados en el tejido adiposo produciendo ácidos grasos. Por tanto, se observa un aumento de la expresión los genes implicados en la lipólisis (*Hsl* y *Atgl*) (Finn and Dice, 2006; Palou et al., 2008; Zimmermann et al., 2004). Los ácidos grasos producidos son oxidados fundamentalmente en el hígado, pero también en el propio tejido adiposo y el músculo, mediante β -oxidación mitocondrial y perioxosomal. El aumento de la oxidación de los ácidos grasos producidos está asociado al aumento de la expresión de los genes implicados en este proceso como la *Cpt1* (tanto las isoformas específicas del hígado como del tejido adiposo) y la Acil coenzima A oxidasa 1 (*Acox1*, *Acyl-coenzyme A oxidase 1*), ambos genes diana de el *Ppara* (Finn and Dice, 2006; Palou et al., 2008). El aumento de la lipólisis y la β -oxidación en condiciones de ayuno, va acompañado de una disminución de la lipogénesis, tanto en el tejido adiposo como en el hígado. Esta adaptación metabólica al ayuno parece implicar cambios en

los principales factores de transcripción lipogénicos, disminuye la expresión de *Ppar γ* (factor de transcripción adipogénico) y el *Srebp* (promotor de la expresión de genes lipogénicos). Por su parte, la disminución de la expresión del factor *Srebp* produce una inhibición de la expresión de los genes lipogénicos que regula, como la *Fasn* o la *Acc* (Palou et al., 2008; Palou et al., 2010b). Las adaptaciones metabólicas a nivel de expresión génica son reguladas de manera diferente en los diferentes depósitos del tejido adiposo. El depósito retroperitoneal presenta una mayor actividad metabólica que los demás depósitos de TAB, de manera que es el primer tejido en mostrar la inhibición de la expresión de genes lipogénicos en una situación de ayuno. Estas diferencias regionales en la respuesta al ayuno indican que el TAB retroperitoneal es el más sensible a la acción de la insulina y otras moléculas reguladoras (Palou et al., 2010b).

La mayoría de los cambios metabólicos y hormonales que se producen durante un periodo de ayuno, se recuperan con un corto periodo de realimentación (3 horas). Sin embargo, con un periodo de realimentación corto, no hay un patrón claro de la recuperación de la expresión de genes implicados en el metabolismo lipídico en los diferentes depósitos de TAB, pero si en el hígado en cuanto a los genes implicados en la lipólisis y β -oxidación (Palou et al., 2008; Palou et al., 2010b). Con un periodo de tiempo más largo (6 horas), en el tejido adiposo mesentérico se observa la recuperación de los niveles de expresión de los factores de transcripción implicados en la lipogénesis y adipogénesis (*Srebp* y *Ppar γ*) (Caimari et al., 2010a).

La lipólisis aumenta en condiciones de ayuno, proporcionando la liberación de NEFA al torrente sanguíneo, utilizado por los demás órganos como fuente de energía. Esta respuesta al ayuno se ve atenuada con la edad, a lo cual puede contribuir la alteración de la regulación de genes clave como el de la *Atgl* en el tejido adiposo; ya que el aumento en la expresión de *Atgl* en respuesta al ayuno se pierde con el envejecimiento (Caimari et al., 2008). La obesidad es otra de las situaciones asociadas a alteraciones en la respuesta a las condiciones de ayuno/alimentación.

2.5.- Alteraciones de la homeostasis energética en la obesidad

La obesidad se define como una acumulación excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud. Esta patología afecta a la expresión y regulación de las moléculas que participan en la homeostasis energética y en el mantenimiento del peso corporal (Picó et al., 2002). Esta acumulación excesiva de grasa está asociada a elevados niveles de leptina e insulina, por ello la obesidad está asociada a una hiperleptinemia e hiperinsulinemia, además de a la resistencia a la insulina y otras alteraciones ligadas al síndrome metabólico (hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia) (Caimari et al., 2010b; Picó et al., 2002; Sampey et al., 2011).

A parte de la desregulación de los parámetros séricos, la obesidad está ligada a una desregulación del control del apetito (Ebal et al., 2007; Morris et al., 2008). Por ejemplo, ratones alimentados con dietas obesogénicas presentan una reducción en la expresión del *receptor de la leptina* y del *Npy* en el hipotálamo (Morris et al., 2008; Velloso and Schwartz, 2011). Además esta patología está asociada a alteraciones en el metabolismo lipídico en los diferentes tejidos implicados en el control de la homeostasis energética (hígado, tejido adiposo, músculo), como una adaptación fisiológica para hacer frente a la elevada acumulación de grasa (Díaz-Rúa et al., 2014; Estadella et al., 2004). Resumidamente, estos cambios hacen referencia a un incremento de la termogénesis adaptativa y un aumento de la lipólisis, así como una

disminución de la lipogénesis (Caimari et al., 2007; Coelho et al., 2011; Priego et al., 2009; Puigserver et al., 1991; Rodríguez and Palou, 2004).

El aumento de la lipólisis y β -oxidación basal asociado a la obesidad se debe a la pérdida de sensibilidad a la señalización de la insulina de los adipocitos. En ratas obesas se ha demostrado la pérdida de la inhibición de la lipólisis mediada por la insulina (Stevens et al., 1981). En humanos, la pérdida de la inhibición mediada por la insulina de la lipólisis se ha demostrado en mujeres con obesidad visceral (Johnson et al., 2001), sin embargo existe una gran controversia ya que otros estudios no observan esta pérdida de la actividad antilipolítica de la insulina (Howard et al., 1984). Además, el aumento de la lipólisis también se asocia, en humanos, con el aumento de la producción de TNF α en los adipocitos (Ryden et al., 2002; Rydén et al., 2004). Muchos estudios demuestran que la expresión de *Atgl* y *adiponutrina* (enzima encargada de la hidrólisis de triglicéridos en los adipocitos) esta alterada en individuos con obesidad genética (Caimari et al., 2007). Sin embargo, otros estudios presentan una disminución de la expresión de genes lipolíticos, como la *Atgl*, en animales con obesidad inducida por dieta (Oliver et al., 2012). Por otra parte, la obesidad aumenta la oxidación de los ácidos grasos. En animales genéticamente obesos se ha demostrado un aumento de la oxidación de los ácidos grasos, asociado con un aumento de los enzimas implicados, como *Cpt1*, pero no ligado al aumento de *Ppara*. Mientras que en animales con obesidad inducida por dieta el aumento de la expresión de genes implicados en la oxidación de ácidos grasos, como *Cpt1*, está ligado al aumento de la expresión del factor transcripcional *Ppara* (Abel, 2010). Finalmente, el consumo de dietas obesogénicas induce un aumento de la expresión de las proteínas termogénicas. Varios estudios en roedores ponen de manifiesto que el consumo de una dieta hiperlipídica induce la expresión de UCP3 en el músculo, actuando como un mecanismo de defensa al aumento del peso corporal (Rodríguez et al., 2003).

La lipogénesis también se encuentra alterada en los organismos obesos. Muchos estudios muestran como en el estado obeso está asociado a una alteración de la expresión de genes lipogénicos y adipogénicos esenciales (*Ppar γ* , *Srebp1*, *Scd-1*, *Fasn*) (Al-Hasani and Joost, 2005). Sin embargo, al igual que con los genes lipolíticos, hay mucha controversia de cómo se regula la expresión basal de los genes lipogénicos y adipogénicos en individuos obesos, ya que algunos estudios muestran una disminución de la regulación de estos genes, mientras que otros muestran un aumento. Estudios con ratones obesos genéticamente ponen de manifiesto la relación entre una disminución de la expresión de genes lipogénicos y el desarrollo de la obesidad o diabetes mellitus (Nadler et al., 2000). Esta alteración de la expresión de genes lipogénicos y adipogénicos también se pone de manifiesto en estudios realizados con ratones alimentados con dietas obesogénicas. Mediante un análisis de expresión génica global (*microarrays*) se ha observado cómo la obesidad inducida por dieta produce una inhibición de la expresión de genes relacionados con la síntesis de ácidos grasos como, *Ppar γ* , *Srebp1*, *Scd-1*, *Fasn* (López et al., 2003). Sin embargo, Li y colaboradores en un estudio realizado con ratas obesas alimentadas con una dieta alta en grasa muestran, como se aumenta la expresión de genes implicados en la lipogénesis (Li et al., 2002).

La obesidad también está asociada a la insensibilidad a las condiciones de alimentación (ayuno y realimentación) (Caimari et al., 2008; Caimari et al., 2010b; Oliver et al., 2013). Por ejemplo, un estudio realizado con ratas muestra como una restricción calórica durante la gestación, modelo de predisposición a la obesidad, produce una pérdida de respuesta al ayuno a nivel de la expresión génica de genes

implicados en el control de la ingesta en el hipotálamo, con una predisposición a presentar resistencia a la insulina y leptina (García et al., 2010). En este proyecto de tesis doctoral se ha utilizado precisamente la alteración en la respuesta al ayuno de genes clave en PBMC como indicador de alteraciones metabólicas asociadas a la aparición de la obesidad. Por otra parte, la recuperación de la respuesta al ayuno se ha utilizado como indicador de recuperación metabólica asociada a la pérdida de peso.

2.6.- Modelos animales para el estudio de la obesidad y la pérdida de peso

Los modelos animales de roedores son muy útiles para estudios de obesidad, incluso en casos de obesidad inducida por el consumo de dietas ricas en grasa (Buettner et al., 2007; Caimari et al., 2007; Estadella et al., 2004; Rodríguez and Palou, 2004), principal causa del incremento de la obesidad en las últimas décadas. Hay dos tipos de dietas ricas en grasa utilizadas en estudios de obesidad, la dieta hiperlipídica comercial y la dieta de cafetería, que poseen diferentes características a tener en cuenta a la hora de detallar un experimento. Las dietas hiperlipídicas comerciales (disponibles en diferentes porcentajes de grasa y diferentes proporciones de macronutrientes) son dietas purificadas, por lo que en su elaboración tan solo se usan ingredientes puros o que no varíen. Estas dietas presentan poca variabilidad entre lotes, ya que cada nutriente está proporcionado por un ingrediente aislado y purificado. Sin embargo, la dieta de cafetería es una dieta hipercalórica y rica en grasa que se asemeja a la ingesta de las sociedades occidentales, por lo que son muy útiles en estudios de obesidad. Esta dieta está compuesta por una variedad de alimentos que varía en función del estudio y la región donde se realiza, por ejemplo, en nuestro laboratorio es una dieta muy utilizada y está compuesta por: ensaimada, magdalenas, queso, paté, sobrasada, galletas, cacahuets, queso, tocino, caramelos blandos y leche con un 20% (p/v) de azúcar, y para asegurar los requerimientos nutricionales también se ofrece un pienso control a los animales (Caimari et al., 2010b; Roca et al., 1999). La dieta de cafetería, al estar compuestas por una variedad de alimentos permite poco control y además originan mayor variabilidad que las dietas purificadas, ya que la ingesta de los animales varía según sus preferencias. Aunque ambas dietas están asociadas al desarrollo de la obesidad, causan diferentes grado de sobrepeso y obesidad (de Wilde et al., 2009; Gallou-Kabani et al., 2007; Manrique et al., 2013; Priego et al., 2009; Sampey et al., 2011). La dieta cafetería es muy sabrosa, y produce un elevado grado de hiperfagia acompañado de un rápido y persistente aumento de peso (Sampey et al., 2011), mientras que la dieta hiperlipídica comercial produce un elevada ingesta al inicio, acompañada de un elevado aumento de peso que se estabiliza a lo largo del tiempo ya que decrece la ingesta calórica hasta niveles similares a los controles (Caimari et al., 2010c; Morris et al., 2008; Sampey et al., 2011; Vial et al., 2011). Por ello, la dieta de cafetería es el mejor modelo para estudiar la obesidad humana en roedores, aunque faltan estudios que comparen ambas dietas en diferentes aspectos (niveles parámetros séricos y a nivel de expresión génica).

Por otra parte en los últimos años ha aumentado el interés acerca de la recuperación de las alteraciones de la obesidad mediante estrategias dietéticas o de ejercicio físico en humanos (Aranceta Bartrina, 2013; Lien et al., 2013). Para estudiar la capacidad de revertir las alteraciones metabólicas causadas por dietas con elevado contenido en grasa es muy útil el modelo de post-cafetería. Este modelo consiste en alimentar animales con dietas obesogénicas durante un período de tiempo suficiente para inducir alteraciones metabólicas y posteriormente sustituir esta dieta por una equilibrada (Lladó et al., 1991; Rodríguez et al., 2003). Aunque nuestro grupo tiene

una amplia experiencia en este modelo experimental (Lladó et al., 1996; Lladó et al., 1991; Matamala et al., 1996; Proenza et al., 1992; Puigserver et al., 1991), en la mayoría de estudios la dieta era administrada desde edades muy tempranas (10 días de edad) de tal manera que al cambiar la dieta de cafetería por una dieta control no se revertían totalmente los efectos, y los animales presentaban unas alteraciones persistentes (Lladó et al., 1996; Lladó et al., 1991; Matamala et al., 1996; Proenza et al., 1992) y una mayor predisposición a almacenar grasa en la edad adulta, cuando estaban expuestos a dietas obesogénicas (Proenza et al., 1992). Estos estudios ponen de manifiesto la incapacidad de revertir las alteraciones metabólicas, producidas por la ingesta de dietas hipercalóricas en edades tempranas, debida a la generación de una huella permanente en el genoma, lo que se conoce como *metabolic imprinting*, que altera permanentemente la regulación del peso corporal en etapas posteriores. Por otra parte, la capacidad de recuperar las alteraciones metabólicas asociadas al consumo de una dieta de cafetería en la edad adulta no está clara. Aunque, diferentes estudios han analizado los efectos de la reversión de una dieta de cafetería en la edad adulta, los resultados son controvertidos, varios de estos estudios indican la incapacidad de la recuperación del peso corporal (Harrington and Coscina, 1983; Rolls et al., 1980; South et al., 2012), mientras que otros muestran una completa reversión (Levin and Dunn-Meynell, 2002; Levin and Keeseey, 1998; Ong et al., 2013; Sclafani and Springer, 1976).

2.7.- PBMC como reflejo del metabolismo energético y la obesidad

Las PBMC, tal y como hemos descrito en apartados anteriores (ver apartado **1.2.2.- PBMC en estudios de nutrición y obesidad**), son un tejido diana interesante para estudios de nutrición y obesidad, ya que reflejan cambios nutricionales a nivel de expresión génica. A grandes rasgos, estas células responden a nivel de expresión génica ante dietas o nutrientes específicos (Bouwens et al., 2009; Browning et al., 2014; Caimari et al., 2010c), responden a cambios en las condiciones de alimentación (ayuno y realimentación) (Bouwens et al., 2007; Caimari et al., 2010a; Caimari et al., 2010b), a la ganancia de peso inducida por dietas obesogénicas (Caimari et al., 2010b, d; Sánchez et al., 2012) y a la pérdida de peso asociada a dietas hipocalóricas (Crujeiras et al., 2008b; de Mello et al., 2012; do Amaral et al., 2014; Goyenechea et al., 2009a; Goyenechea et al., 2009b).

Está bien descrito que estas células son susceptibles a la acción de hormonas metabólicamente importantes, como insulina (Goldstein et al., 1975; Powers et al., 1980), glucagón (Goldstein et al., 1975; Neal et al., 1983) y leptina (Tsiotra et al., 2000). Además, las PBMC expresan moléculas relacionadas con la homeostasis energética, como leptina (Samara et al., 2008), visfatina (Tsiotra et al., 2007) y ghrelina (Mager et al., 2008). Debido a la regulación hormonal que presentan estas células, no resulta extraña su capacidad de responder a cambios en las condiciones de alimentación, reflejando los cambios metabólicos en respuesta al estado nutricional (Bouwens et al., 2007). Nuestro grupo ha demostrado previamente, mediante análisis de expresión génica total por microarray, cómo las condiciones de ayuno y realimentación producen un importante impacto en la regulación de genes clave para la homeostasis energética en PBMC de ratas (Caimari et al., 2010a). Concretamente, el ayuno produce un aumento de los genes implicados en la β -oxidación y una disminución de los genes implicados en la lipogénesis (*Fasn* y *Srebp1*) y adipogénesis (*Ppar γ*), comportamiento típico del hígado y tejido adiposo. Además, las PBMC muestran la recuperación de los niveles basales de expresión génica tras un periodo de

realimentación de 6 horas, al igual que ocurre en el tejido adiposo (Caimari et al., 2010a). También se ha descrito que la expresión de genes implicados en el metabolismo de los esteroides se ven regulados por las condiciones de alimentación en PBMC, de manera semejante al hígado por lo que parece que presentan los mismos mecanismo de regulación (Caimari et al., 2010b).

Además de ser consideradas buenos marcadores de las adaptaciones metabólicas que tienen lugar en situaciones de alimentación, ayuno y realimentación, las PBMC reflejan la insensibilidad a las condiciones de alimentación tal y como ocurre en el hígado y tejido adiposo (Caimari et al., 2010a; Caimari et al., 2010b). Así, la cantidad de genes cuya expresión se ve afectada en un microarray de todo el genoma, en respuesta a las condiciones de ayuno y realimentación, es mucho menor en PBMC de ratas obesas que en ratas normopeso (Caimari et al., 2010a; Caimari et al., 2010b).

Finalmente las PBMC también se perfilan como una fuente de biomarcadores de obesidad. Nuestro grupo ha demostrado cómo la expresión génica total analizada en PBMC utilizando microarrays varía entre ratas normopeso y obesas (Caimari et al., 2010a; Caimari et al., 2010c). En este estudio se describió un gen, que codifica para el transportador de ácidos grasos de cadena larga, cuya expresión aumentaba claramente a lo largo del desarrollo de obesidad, ya desde etapas tempranas (Caimari et al., 2010c). Concretamente, el gen codifica para el miembro 2 de la familia 27 de transportadores de ácidos grasos (*Slc27a2*, *Solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 2*) que además de transportar ácidos grasos está implicado en la degradación y en la síntesis de ácidos grasos.

En resumen, las PBMC reflejan la regulación nutricional (ayuno y realimentación), así como cambios en la expresión génica en respuesta a la ingesta de dietas obesogénicas, y los efectos de la obesidad que tienen lugar en el hígado y en el tejido adiposo. Por ello, estas células son de gran interés en clínica y en estudios de intervención. Además, en humanos, las PBMC suponen un material biológico fácilmente y repetidamente obtenible en cantidad suficientes para estudios de perfil transcriptómico, en comparación con otros tejidos de más difícil obtención. Por todo ello, es de gran interés seguir profundizando en el estudio de la utilidad de estas células, en estudios de metabolismo energético y sus alteraciones, con el objetivo de obtener marcadores genómicos que puedan ser usados para la prevención de la obesidad y complicaciones asociadas.

Capítulo II.- OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

II.- OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

Las PBMC constituyen un material biológico fácilmente obtenible y en cantidades suficientes mediante una simple extracción de sangre, siendo posible, además, obtener muestras a diferentes tiempos (Liew et al., 2006). Estas células son muy utilizadas tanto en clínica como en investigación para la detección de enfermedades ya que reflejan patrones de expresión característicos de ciertas patologías (Cigna et al., 2013; Goleva et al., 2012; Tsiotra et al., 2008). En los últimos años también se están utilizando las PBMC en estudios de nutrición, ya que se ha descrito que son capaces de modificar su expresión génica ante diferentes compuestos nutricionales, y de responder al ayuno de igual manera que tejidos homeostáticos clave como el hígado o el tejido adiposo (Caimari et al., 2010a; de Mello et al., 2012; Konieczna et al., 2014). Estudios previos de nuestro laboratorio han puesto de manifiesto que la expresión génica de las PBMC se ve alterada en animales obesos, y que estas células reflejan alteraciones metabólicas, como por ejemplo, la insensibilidad al ayuno, característica del estado obeso (Caimari et al., 2010a; Caimari et al., 2010b; Caimari et al., c). Por otro lado, en los últimos años se ha descrito la existencia de tejido adiposo marrón en humanos, así como la posibilidad de que el abundante tejido adiposo blanco puede remodelarse a tejido adiposo marrón en un proceso conocido como marronización frente a estímulos como la dieta o compuestos bioactivos de los alimentos, el frío, así como determinados fármacos, lo que abre nuevas posibilidades terapéuticas en el campo de la obesidad (Bonet et al., 2013). A partir de estos estudios se desarrolla el objetivo principal de la tesis, que consiste en identificar la utilidad de esta interesante fracción de células sanguíneas, las PBMC, como fuente de marcadores para ser usados en la prevención y tratamiento de la obesidad y sus complicaciones.

En el presente estudio de tesis se pretende pues profundizar en el conocimiento de las PBMC como herramienta para la obtención de biomarcadores de obesidad, centrándonos preferiblemente en los marcadores tempranos. El principal objetivo ha sido, por un lado, definir la utilidad de las PBMC para identificar las alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad durante el desarrollo de esta patología, para lo cual se ha analizado si estas células son capaces de reflejar la insensibilidad al ayuno en animales alimentados con una dieta obesogénica a medida que los animales van ganando peso; también se ha definido cómo se ve alterada la expresión de genes característicos de obesidad en diferentes estadios de la patología (identificación de un perfil obesogénico en PBMC). Por otro lado, se ha tratado de determinar si las PBMC son capaces de reflejar la recuperación metabólica asociada a la pérdida de peso, al sustituir una dieta hiperlipídica por una dieta equilibrada. Por último, un objetivo claramente innovador ha sido el de determinar si las PBMC son capaces de reflejar la activación del tejido adiposo marrón así como la marronización del tejido adiposo blanco. La identificación de biomarcadores tempranos contribuirá a la detección precoz del riesgo de desarrollar obesidad y complicaciones asociadas, lo que permitirá diseñar actuaciones preventivas adecuadas. Además, la identificación de biomarcadores de recuperación metabólica, aportaría un valor añadido a las terapias de pérdida de peso corporal. Por último, la posible utilidad de las PBMC como fuente de marcadores relacionados con el estudio del tejido adiposo marrón sería de gran utilidad por su posible extrapolación a humanos, donde este tipo de estudios supone hoy en día el uso de técnicas altamente invasivas.

1.- Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) como material biológico para el estudio de la desregulación de la homeostasis energética asociada al desarrollo de la obesidad y la recuperación metabólica ligada a la pérdida de peso corporal

El uso de las PBMC para el diagnóstico de determinadas enfermedades está en auge (Baine et al., 2011; Cappuzzello et al., 2009), además, estas células son útiles en estudios nutricionales (de Mello et al., 2012). De manera previa, nuestro grupo de investigación había descrito que las PBMC son capaces de reflejar la insensibilidad al ayuno característica del estado obeso, en ratas con obesidad inducida por dieta de cafetería (Caimari et al., 2010a; Caimari et al., 2010b; Caimari et al., 2010c). En este sentido, nos interesó estudiar si las PBMC también eran capaces de reflejar alteraciones en el control de la homeostasis energética, reflejada como insensibilidad al ayuno, no solo en animales ya obesos, sino durante el desarrollo de la obesidad, para determinar posibles marcadores de desequilibrios homeostáticos en un estado pre-obeso. Como modelo animal utilizamos ratas Wistar machos de 2 meses de edad, a las que se les indujo obesidad mediante la alimentación con dieta de cafetería, una dieta muy rica en grasa que produce un alto grado de hiperfagia y hace que se desarrolle un elevado grado de obesidad asociada a complicaciones metabólicas, de manera similar a lo que ocurre en la obesidad en humanos. La dieta de cafetería se suministró durante 4 meses, desde los 2 hasta los 6 meses de edad, momento en que las ratas alcanzaron un 29% de sobrepeso respecto a las ratas alimentadas con pienso estándar. A los 2, 3, 4 y 6 meses de edad las ratas fueron agrupadas en 3 grupos experimentales: control (alimentación *ad libitum*), ayuno (ayuno nocturno de 12-14 horas) y realimentación (realimentación de 6 horas tras un ayuno de 14 horas), con la finalidad de obtener sangre en diferentes condiciones de alimentación. Después de la extracción de sangre de la vena safena, se aislaron las PBMC y posteriormente se extrajo y purificó el ARN total, y se realizó un estudio de expresión de genes relacionados con la lipogénesis (*Fasn* y *Srebp1*), adipogénesis (*Ppar γ*), lipólisis (*Cpt1a*) y control de la ingesta (*Npy*) mediante RT-PCR a tiempo real. Para comprobar que las PBMC reflejaban la misma respuesta homeostática que la que se da en tejidos clave, también se analizó la expresión de estos genes en el depósito de TAB retroperitoneal y en hígado en las diferentes condiciones de alimentación. Además, en estos animales se determinaron los niveles séricos de glucosa con un glucómetro, y de insulina y leptina por ELISA (**manuscrito 1**).

Debido al gran aumento de la obesidad, ha aumentado el interés acerca de estrategias de pérdida de peso asociadas a la adopción de un estilo de vida saludable (Aranceta Bartrina, 2013; Lien et al., 2013). Por ello, además de estudiar la insensibilidad en el control de la homeostasis energética en PBMC durante el desarrollo de la obesidad, quisimos describir si estas células son capaces de reflejar la recuperación metabólica asociada a la pérdida de peso. Primero quisimos diseñar un modelo animal para poder estudiar la pérdida de peso/adiposidad y la capacidad de recuperación metabólica (a nivel de parámetros séricos y de expresión génica). Para este tipo de estudios resulta muy interesante el modelo de post-cafetería, en el que nuestro grupo cuenta con una amplia experiencia. Este modelo consiste en administrar una dieta obesogénica (dieta de cafetería) hasta conseguir el desarrollo de obesidad y complicaciones metabólicas, y sustituir posteriormente dicha dieta por una dieta control equilibrada. Sin embargo, en la mayoría de nuestros estudios previos la dieta obesogénica se administraba desde edades muy tempranas, de tal manera que al cambiar esta dieta por una dieta control no se revertían totalmente sus efectos, y los

animales presentaban una obesidad persistente (Lladó et al., 1996; Matamala et al., 1996). Por otra parte, y aunque existen numerosos estudios en los que se administra una dieta obesogénica en la edad adulta y luego se sustituye por una dieta control, existe una gran controversia entre ellos, algunos evidencian recuperación del peso corporal y otros no (Levin and Dunn-Meynell, 2002; Levin and Keeseey, 1998; South et al., 2012). Por ello, en esta tesis quisimos estudiar en más detalle la capacidad de revertir el peso corporal y las alteraciones metabólicas asociadas al consumo de dietas obesogénicas en la edad adulta. Además, en este mismo diseño experimental quisimos comparar, en detalle, las alteraciones metabólicas causadas por la dieta de cafetería y una dieta hiperlipídica comercial, con el fin de definir un buen modelo de obesidad. Aunque la dieta de cafetería se ha descrito como la mejor dieta inductora de la obesidad, siendo el mejor modelo para reproducir la obesidad humana (Sampey et al., 2011), faltan estudios que corroboren sus efectos a nivel de expresión génica en los tejidos homeostáticos clave. Por ello, en el presente proyecto de tesis nos interesó, también, estudiar si la dieta rica en grasa disponible comercialmente y la dieta de cafetería producían efectos comparables a nivel de expresión génica en diferentes tejidos homeostáticos (hígado, músculo y tejido adiposo blanco y marrón). Para llevar a cabo estos dos objetivos utilizamos ratas Wistar machos de 2 meses de edad, que fueron distribuidas en 4 grupos y alimentadas con diferentes tipos de dieta durante 4 meses (Experimento 1), desde los 2 a los 6 meses de edad: grupo control, alimentado con un pienso control; grupo cafetería, alimentado con dieta de cafetería, grupo “high fat”, alimentado con una dieta comercial rica en grasa, y grupo post-cafetería, alimentado durante 2 meses con dieta de cafetería y durante otros 2 meses con dieta control. Además, se usó un modelo experimental adicional (Experimento 2), en el que se administró dieta de cafetería por un tiempo más corto, 3 meses, desde los 2 a los 5 meses de edad y se usó un grupo post-cafetería también con un tratamiento nutricional más corto, 1,5 meses de dieta de cafetería seguido por 1,5 meses de dieta control. Tanto la dieta de cafetería como la hiperlipídica comercial utilizada aportaron una cantidad similar de grasa, aproximadamente el 60% de las calorías totales. En ambos modelos se analizó, la expresión de genes lipogénicos (*Fasn* y *Srebp1*), lipolíticos (*Atgl* y *Cpt1a*) en el hígado, músculo, TAB (inguinal y retroperitoneal) y TAM. En el hígado también se analizó la expresión del gen lipolítico *Fgf21*. En cuanto a parámetros antropométricos, se determinó el peso y el contenido de masa grasa durante a lo largo del desarrollo, y a punto final del experimento se determinó el peso de los diferentes depósitos grasos y se calculó el índice de adiposidad. También se midieron los niveles séricos de glucosa con un glucómetro, y de insulina, triglicéridos y leptina por ELISA. Se calculó el índice HOMA-IR y se realizó un test de tolerancia oral a la glucosa. Además, para determinar el grado de esteatosis hepática, se determinó el contenido de lípidos en el hígado, y se realizó un análisis histológico (**manuscrito 2**).

Tras definir y caracterizar en detalle el modelo animal de recuperación metabólica, quisimos validar si las PBMC son una buena herramienta para reflejar los cambios tras sustituir una dieta obesogénica por una dieta más equilibrada, con lo cual estas células podrían utilizarse como fuente de marcadores biológicos para estudiar el efecto de diferentes estrategias de pérdida de peso. Para ello, al final de ambos diseños experimentales, a los 5 y 6 meses de edad, se extrajo sangre de la vena safena, se aislaron las PBMC y posteriormente se extrajo y purificó el ARN y se analizó la expresión de genes implicados en la lipólisis (*Cpt1a*), lipogénesis (*Fasn* y *Srebp1*), adipogénesis (*Ppar γ*) y control de la ingesta (*Npy*) mediante RT-PCR a tiempo real. Además, para corroborar que estas células reflejan la expresión hipotalámica de *Npy*,

en el Experimento 2 se analizó la expresión génica de este péptido en el propio hipotálamo (**manuscrito 3**).

Finalmente, dado que las PBMC se han definido como un buen material biológico para el estudio de enfermedades, y presentan un perfil transcriptómico diferencial entre individuos enfermos y sanos (Baine et al., 2011; Cigna et al., 2013), nos planteamos determinar, en estas células, un perfil transcriptómico característico de la obesidad. Para ello usamos los animales del diseño experimental explicado en el apartado anterior, ratas control, ratas alimentadas con dieta hiperlipídica comercial o con dieta de cafetería (administrada durante 4 meses) y ratas alimentadas con dieta control durante 2 meses después de haber recibido dieta cafetería durante 2 meses. A los 2, 3, 4, 5 y 6 meses de edad se extrajo sangre de la vena safena y se aislaron las PBMC, posteriormente se extrajo y purificó el ARN, y se determinó, mediante RT-PCR a tiempo real, la expresión de genes implicados en metabolismo energético (*Cpt1a*, *Fasn* y *Srebp1*), en la inflamación (*Tnfa* y *Il-6*), así como genes relacionados con el desarrollo de obesidad inducida por la dieta, como el gen que codifica para el receptor de la apoproteína b 48 (*Apob48r*, *apoprotein B48 receptor*), el factor de transcripción *Cebp β* (*Cebpb*, *CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) β* transcription factor) y *Slc27a2*. Además, en estos animales se determinó el peso y el contenido de masa grasa, se midieron los niveles séricos de glucosa, leptina y triglicéridos, y se determinó el índice HOMA-IR y contenido lipídico del hígado (**manuscrito 4**).

2.- Las PBMC como material biológico para el estudio de la activación del tejido adiposo marrón y de la conversión de tejido adiposo blanco a marrón (marronización)

El papel del TAM en el tratamiento de la obesidad está en auge desde que se ha demostrado la presencia de este tejido en humanos adultos (Nedergaard et al., 2007). Además, se ha descrito que bajo ciertos estímulos, como dietas ricas en grasa (Kus et al., 2008) o exposición al frío (Cinti et al., 2002), el TAB puede remodelarse a TAM, lo que abre nuevas posibilidades terapéuticas para el tratamiento de la obesidad (Bonet et al., 2013). Durante el proceso de remodelación aparecen adipocitos conocidos como *brite*, que presentan características de adipocitos marrones pero se encuentran en los depósitos de TAB, sobretudo en el depósito inguinal y retroperitoneal (Sharp et al., 2012; Wu et al., 2012). De manera novedosa, en este proyecto de tesis hemos querido abordar si las PBMC pueden ser de utilidad para el estudio del tejido adiposo marrón. Para ello, en primer lugar analizamos si las PBMC de rata expresaban marcadores característicos de adipocitos marrones/*brite*, y posteriormente analizamos su respuesta frente a dos estímulos capaces de activar el tejido adiposo marrón: administración de dietas obesogénicas (dieta de cafetería y dieta comercial rica en grasa) y exposición al frío.

Para analizar el efecto de las dietas obesogénicas se utilizaron los mismos animales que en el manuscrito 4, ratas Wistar macho de 6 meses de edad, alimentadas con dos dietas hiperlipídicas (hiperlipídica comercial y dieta de cafetería) administradas durante 4 meses, de los 2 a los 6 meses de edad, y ratas alimentadas con dieta control durante 2 meses tras 2 meses de dieta de cafetería. Se trabajó con muestras de PBMC obtenidas a punto final en las que se analizó la expresión génica de genes definidos como marcadores de adipocitos marrones (*Cidea*, *Ebf3*, *Eva1*, *Fbxo31*, *Fgf21*, *Prdm16*, *Tbx15* y *Ucp1*) y de adipocitos *brite* (*Hoxc9*, *Slc27a1* y

Tmem26) mediante RT-PCR a tiempo real. De manera paralela se analizó la expresión de estos marcadores en TAB retroperitoneal y en TAM interescapular (**manuscrito 5**).

Para analizar el efecto del frío se utilizó un nuevo diseño experimental, ratas Wistar hembras de diferentes edades (1, 2, 4 y 6 meses), estabuladas a 22°C o a 4°C durante una semana. En estos animales se determinó tanto el peso corporal antes y después de la exposición al frío, como el peso de los diferentes depósitos de tejido adiposo blanco (para determinar el índice de adiposidad), el peso TAM, y los niveles séricos de glucosa y ácidos grasos libres. En estos animales se recogió sangre, se aislaron las PBMC, y posteriormente se extrajo y purificó el ARN, y se analizó la expresión de genes definidos como marcadores de adipocitos marrones y de adipocitos *brite* mediante RT-PCR a tiempo real. Además, para corroborar que estas células reflejan la inducción del tejido adiposo marrón y la remodelación del TAB a TAM, se estudió la expresión génica de marcadores de adipocitos marrones (*Cidea*, *Fgf21*, *Pgc1 α* , *Prdm16* y *Ucp1*) y adipocitos *brite* (*Hoxc9*, *Slc27a1*) en el depósito de TAB retroperitoneal, y en el TAM interescapular. Adicionalmente se realizó un estudio morfológico y un análisis inmunohistoquímica de CIDE-A y UCP1 en el TAB retroperitoneal (**manuscrito 6**).

Los roedores son el modelo más utilizado para realizar estudios sobre activación del TAM y marronización del TAB. Sin embargo, el tejido adiposo de los roedores tiene importantes diferencias con el de humanos. Dada la dificultad de llevar a cabo estudios en humanos, sería de gran interés estudiar la activación del TAM y el proceso de marronización en una especie con un metabolismo y una organización del tejido adiposo más semejante a humanos. Estudios previos de nuestro grupo han evidenciado que los hurones pueden resultar especialmente interesantes en este sentido, ya que al igual que los humanos, no poseen un importante depósito de TAM bien definido, sino que tienen adipocitos *brite* en los depósitos de grasa blanca, con capacidad de activarse en respuesta a estímulos como frío (Fuster et al., 2009). Por ello realizamos un experimento en el que utilizamos hurones machos de 3 meses de edad, estabulados a 22°C o a 4°C durante una semana. En estos animales se recogió sangre y se aislaron los PBMC, también se recogieron diferentes depósitos de tejido adiposo (inguinal y periaórtico), y posteriormente se extrajo y purificó el ARN. Con el interés de obtener biomarcadores de la conversión de TAB en TAM con una mayor aplicabilidad a humanos que los que se dispone actualmente (obtenidos en roedores) se realizó un análisis de la expresión génica total (microarray) en las muestras de tejido adiposo, comparando los animales expuestos a frío con los estabulados a temperatura ambiente. Adicionalmente, se ha realizado también un análisis de microarray en las muestras de PBMC, con el objetivo de identificar algún marcador común de respuesta al frío entre el tejido adiposo y las células sanguíneas, lo cual permitiría utilizar estas células para llevar a cabo estudios de marronización con una mínima invasión. Estas determinaciones se realizaron en colaboración con el grupo del Prof. Jaap Keijer, de la Universidad de Wageningen, concretamente en el grupo “Human and Animal Physiology”, con gran experiencia en la técnica de array y en el análisis y tratamiento estadístico de los datos obtenidos.

Capítulo III.- MATERIAL Y MÉTODOS

III.- MATERIAL Y MÉTODOS

1.- Animales de estudio

Para el desarrollo de esta tesis doctoral se utilizaron ratas *Wistar* macho y hembras, procedentes del laboratorio Charles River (Barcelona). Durante el periodo de experimentación los animales permanecieron en el estabulario de la Universidad de las Islas Baleares (UIB), aclimatados a 22°C o 4°C dependiendo del objetivo experimental, con un ciclo de luz y oscuridad 12 h/12 h, con libre acceso al agua. Cuando los objetivos experimentales lo requerían, los animales se pesaron dos veces por semana, se realizaba un control diario de la ingesta, y se determinaba el porcentaje de masa grasa cada 15 días mediante el uso del EchoMRI-700™ (Texas, Estados Unidos). Al final del experimento los animales fueron sacrificados por decapitación. Tras la disección, los tejidos de interés (hipotálamo, hígado, músculo, TAM y diferentes depósitos de TAB: inguinal, retroperitoneal, epididimal o perigonadal, y mesentérico) se pesaron, lavaron en suero salino con 0,1% de dietilpirocarbonato (DEPC) para evitar la degradación del ARN, y se guardaron a -80°C hasta su posterior análisis. Además, se guardaban pequeños fragmentos de tejido para realizar análisis morfológicos. También se recogió la sangre producto de la decapitación para la obtención del suero y para el aislamiento de PBMC. En los animales utilizados en el manuscrito 1, el suero se obtuvo mediante la incubación de la sangre durante 1 h a temperatura ambiente, a 4°C durante toda la noche, y posterior centrifugación a 1000 g durante 10 min. Sin embargo, en el resto de los casos se eliminó la incubación a 4°C durante toda la noche, tras comprobar que la eficiencia del protocolo era similar. El suero obtenido se guardaba a -20°C para su posterior análisis.

Finalmente, en el periodo final de la tesis se utilizaron hurones (*Mustela putorius furo*) macho de 3 meses de edad suministrados por Cunipic (Lleida). Estos animales fueron estabulados en la UIB y aclimatados a 22°C o 4°C, con 12 h de luz y 12 h de oscuridad, y con libre acceso a agua y comida (pienso de Gonzalo Zaragoza Manresa SL). Los animales fueron sacrificados mediante exanguinación tras punción cardíaca, y para ello fueron anestesiados con: 10 mg/kg de *Ketamine hydrochloride* y 80 mg/kg *medetomidine*. Después de la disección de los animales se recogieron los tejidos de interés (hipotálamo, hígado y tejido adiposo de diferentes localizaciones; interescapular, inguinal, retroperitoneal, periaórtico y mesentérico), que fueron pesados y lavados en suero salino con 0,1% de dietilpirocarbonato (DEPC, Sigma) para evitar la degradación del ARN y guardados a -80°C hasta su posterior análisis. Además, pequeños fragmentos de tejido se guardaron para realizar análisis morfológicos. La sangre obtenida mediante la punción cardíaca se recogió para la obtención de suero y para el aislamiento de PBMC. El suero se obtenía mediante la incubación de la sangre durante 1 h a 4°C, y con una centrifugación posterior a 1000 g durante 10 min, y se guardaba a -20°C para su posterior análisis.

Reactivos:

- Dietilpirocarbonato, DEPC (Sigma)
- *Ketamine hydrochloride* (Imalgène 1000, Merial Laboratorios SA)
- *Medetomidine* (Domtor, Orion Pharma)

2.- Inducción de la obesidad mediante dietas ricas en grasa y su reversión

En este proyecto de tesis hemos utilizado dos dietas inductoras de la obesidad: la dieta de cafetería y la dieta hiperlipídica comercial. Concretamente, estas dietas hiperlipídicas se utilizaron para la inducción de la obesidad en los experimentos basados en la identificación de biomarcadores del desarrollo de obesidad y de la recuperación metabólica asociada a la pérdida de peso.

En primer lugar se utilizó la dieta de cafetería para estudiar la desregulación de la homeostasis energética durante el desarrollo de obesidad en PBMC. Por otra parte, la dieta de cafetería y dieta hiperlipídica comercial se utilizaron para evaluar cual de estas dos dietas refleja mejor la obesidad humana. Se administraron ambas dietas de los 2 a los 6 meses de edad para comparar el impacto sobre el peso corporal y otras alteraciones asociadas a la obesidad. Finalmente, la reversión de la dieta de cafetería (modelo de post-cafetería) se utilizó para estudiar la recuperación metabólica asociada a la pérdida de peso en ratas Wistar adultas. Concretamente, para este objetivo se administró la dieta de cafetería, a la edad de 2 meses, durante 1,5 o 2 meses, y posteriormente se substituyó por una dieta control administrada por el mismo periodo de tiempo.

2.1.- Dieta de cafetería

La dieta de cafetería es una dieta con un elevado contenido en grasa, muy apetecible y que produce un elevado grado de hiperfagia, lo que va asociado al desarrollo de la obesidad. Esta dieta está compuesta por los siguientes alimentos: galletas untadas de paté y sobrasada (embutido crudo típico mallorquín), tocino, magdalenas, ensaimada (bizcocho típico mallorquín), *sugus*, chocolate, queso, cacahuetes pelados con sal, zanahoria y leche con 20% (p/v) de azúcar (Caimari et al., 2010c), además pienso estándar o pienso control, dependiendo del pienso administrado al grupo control (Panlab y Ref. D12450B de Research Diets, respectivamente). La composición de macronutrientes de la dieta en función de la ingesta de los animales es: 62% de las calorías en forma de grasa, 27% en forma de carbohidratos y 11% en forma de proteínas (Ribot et al., 2008). La dieta de cafetería se preparaba diariamente en exceso, a excepción de los domingos.

2.2.- Dieta hiperlipídica comercial

La dieta hiperlipídica comercial (Ref. D12492 de *Research diets*, Dinamarca) presenta la siguiente composición de macronutrientes: 60% de calorías en forma de grasa, 20% de carbohidratos y 20% de proteínas. Por tanto, proporciona a los animales una proporción de grasa similar a la dieta de cafetería. Además, el perfil de ácidos grasos (saturados/insaturados) es similar en ambas dietas.

3.- Extracción de sangre y aislamiento de PBMC

La obtención de las PBMC se realizaba a partir de sangre procedente de la vena safena o producto de la decapitación. El primer paso para la extracción de sangre procedente de la vena safena era la inmovilización de la rata; una vez inmovilizado el animal se depilaba la zona de la vena y se procedía a la punción mediante una aguja.

La sangre se recogía mediante el uso de una pipeta y se introducía en un *ependorf* con anticoagulante (heparina o ácido etilendiaminotetraacético, EDTA).

En este proyecto de tesis se han aislado PBMC utilizando dos tipos diferentes de gradientes de densidad, *Ficoll-PaqueTM PLUS* y *OptiPrep*, que permiten separar las células de la sangre mediante una centrifugación diferencial.

3.1.- Aislamiento de PBMC mediante *Ficoll-PaqueTM PLUS*

El protocolo basado en el uso del polisacárido hidrofílico *Ficoll-PaqueTM PLUS* precisaba de 1,5 - 2 ml de sangre, mezclada con 600 µl de heparina disuelta en NaCl 0,9%, y 1,5 ml de solución salina equilibrada (BSS, *Balanced Salt Solution*), solución salina con glucosa que mantenía la viabilidad de las células sanguíneas. Por cada 2 ml de sangre heparinizada y con BSS, se utilizaba 1,5 ml de *Ficoll-PaqueTM PLUS*. El primer paso consistía en introducir el *Ficoll-PaqueTM PLUS* dentro de un tubo *Corning* de 15 o 50 ml, dependiendo del volumen de sangre obtenido. Seguidamente se introducía la sangre muy lentamente con una pipeta, evitando que se mezclase con la capa de *Ficoll-PaqueTM PLUS*. Después se realizaba una centrifugación a 900 g con una centrífuga de brazo basculante durante 40 min, con el freno a la menor velocidad posible para no perturbar el gradiente de densidad formado. Tras la centrifugación se observaba claramente la separación de los componentes de la sangre, una fase superior amarillenta de plasma, seguida de una interfase que contenía los monocitos y linfocitos (PBMC) situada encima del Ficoll y, finalmente, un precipitado formado por plaquetas, eritrocitos y demás fragmentos celulares. Se recogía la interfase de monocitos y linfocitos con una pipeta *Pasteur*, y se pasaba a un nuevo tubo *Corning*, donde por cada mililitro de células recogidas se añadían 3 ml de tampón BSS, se invertía y se centrifugaba a 900 g durante 10 min sin importar en este caso la velocidad de frenado, para eliminar las plaquetas y limpiar las PBMC. El precipitado obtenido correspondía a la fracción de PBMC que era homogenizada con 1 ml de *Trisure* con la ayuda de una pipeta, y posteriormente se procedía a la extracción del ARN.

Reactivos del protocolo con Ficoll:

- *Ficoll-PaqueTM PLUS* (GE Healthcare Bio Sciences)
- Heparina (Sigma)
- NaCl (Panreac)
- Tampón BSS (*Balanced Salt Solution*), formado por Solución A y Solución B (1:9)
 - o Solución A, pH 7,6: D-glucosa (Merck) 1 g/l, CaCl₂-2H₂O (Panreac) 0,0074 g/l, MgCl₂-6H₂O (Panreac) 0,1992 g/l, KCl (Panreac) 0,4026 g/l, Tris base (Sigma) 17,565 g/l
 - o Solución B: NaCl (Panreac) 8,19 g/l

3.2.- Aislamiento de PBMC mediante *OptiPrep*

El protocolo de aislamiento de PBMC mediante gradiente de densidad de *OptiPrep* utilizado requería de 1,5 a 2 ml de sangre. Este volumen de sangre se mezclaba con 16 µl de EDTA 0,5 M como anticoagulante y con Solución C (Solución que conserva la viabilidad celular, formada por NaCl y HEPES) hasta un volumen de 6 ml. Esta mezcla se introducía cuidadosamente dentro de un tubo *Corning* de 15 ml

que contenía 3 ml de barrera de densidad. Después, se centrifugaba a 700 g con una centrifuga de brazo basculante durante 20 min, con la aceleración y freno a la menor velocidad posible para no perturbar el gradiente de densidad formado. Tras la centrifugación se observaba claramente la separación de los componentes de la sangre, una fase superior amarillenta de plasma, seguida de una interfase que contenía los monocitos y linfocitos (PBMC) situados encima de la barrera de densidad y, finalmente, un precipitado que contenía eritrocitos y demás fragmentos celulares. Se recogía esta interfase con una pipeta *Pasteur*, y se pasaba a un nuevo tubo *Corning*, donde por cada volumen de suspensión de células se añadían 2 volúmenes de Solución C, se invertía y se centrifugaba a 400 g durante 10 min para eliminar las plaquetas y limpiar las PBMC. El precipitado obtenido correspondía a la fracción de PBMC, que era homogenizada con 1 ml de *Tripure* con la ayuda de una pipeta, y posteriormente se procedía a la extracción de ARN.

Reactivos del protocolo con OptiPrep:

- Barrera de densidad, formada por 2,7 ml de *OptiPrep* (Sigma) y 9,3 ml de diluyente de *OptiPrep*
 - o Diluyente de OptiPrep: por cada 2,5 ml de Solución C, 0,5 ml de agua MiliQ estéril
- EDTA (Sigma)
- Solución C, formada por NaCl (Panreac) 146 mM y HEPES (Sigma) 1 mM

4.- Aislamiento de ARN

El aislamiento de ARN de tejido adiposo, hígado, PBMC, hipotálamo y músculo se realizó mediante el método de extracción por *Tripure* o *TRIZol*, siguiendo las instrucciones de la casa comercial, o mediante el kit de extracción *E.Z.N.A. Total RNA Kit I*.

4.1.- Aislamiento de ARN utilizando Tripure o TRIZol

Las muestras se homogenizaban en hielo, en 1 ml de *Tripure* o *TRIZol* mediante el uso de un homogenizador de aspas. Las cantidades de tejido variaban dependiendo de la cantidad de ARN que estos presentan o de la finalidad del estudio. Concretamente, se homogeneizaba todo el hipotálamo, 0,05 g de hígado y músculo y 0,3 g de TAB. En las muestras de hígado, hipotálamo, tejido adiposo y músculo se hizo una precentrifugación a 12000 g durante 5 min a 4°C, para eliminar la grasa y restos celulares. Al sobrenadante obtenido se añadía 200 µl de cloroformo, se agitaba durante 15 seg y se incubaba en frío durante 15 min. Seguidamente, las muestras se centrifugaban a 12000 g durante 15 min a 4°C y se recogía la fase acuosa que contenía el ARN. Para precipitar el ARN se añadían 500 µl de isopropanol y se incubaba durante toda la noche a -20° C. Posteriormente se centrifugaban las muestras a 12000 g durante 10 min a 4°C para obtener el precipitado de ARN. El ARN precipitado se lavaba con 1 ml de etanol 75%. Las muestras se agitaban con vortex hasta despegar el precipitado, y se centrifugaban a 7500 g durante 5 min a 4°C. Finalmente, se eliminaba completamente el etanol y se resuspendía el precipitado de ARN con el volumen adecuado de agua libre de ARNasas.

Reactivos:

- H₂O libre de ARNasas (Sigma)

- Isopropanol (Sigma)
- *Tripure* (Roche)
- *TRIzol* (Invitrogen)

4.2.- Aislamiento de ARN mediante E.Z.N.A. Total RNA Kit I

Para la extracción de ARN de hígado y tejido adiposo también se utilizó el kit de extracción *E.Z.N.A. Total RNA Kit I*. Las muestras se homogenizaban en 700 µl de *TRK lysis buffer*, proporcionado por el kit, con la ayuda de un homogenizador de aspas y se hacía una centrifugación a 13000 g durante 5 min a temperatura ambiente, para eliminar la grasa y restos celulares. A la fase clara resultante de la centrifugación se le añadían 700 µl de etanol 70% y se agitaba con la pipeta. Esta mezcla se introducía en las columnas del kit, y se centrifugaba a 10000 g durante 1 min a temperatura ambiente. Seguidamente se lavaba con 250 µl de *RNA Wash Buffer I*, proporcionado por el Kit, y se centrifugaba a 10000 g durante 1 min a temperatura ambiente. Las columnas, se trataban con 35 µl de solución de DNAasa I, proporcionada por el kit, y se incubaba durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaban las columnas con 250 µl de *RNA Wash Buffer I*, proporcionado por el Kit, y se centrifugaban a 10000 g durante 1 min a temperatura ambiente. A continuación se realizaban dos lavados con 500 µl de *RNA Wash Buffer II*, proporcionado por el Kit, y se centrifugaba a 10000 g durante 1 min a temperatura ambiente. Finalmente se centrifugaban las columnas con los tubos colectores vacíos a 20000 g durante 2 min, y una vez secas las columnas se añadían 20 µl de agua DEPC, proporcionada por el Kit, y se centrifugaban las columnas a 20000 g durante 2 min.

Reactivos:

- Cloroformo (Sigma)
- Etanol absoluto (Panreac)
- *E.Z.N.A. Total RNA Kit I* (Omega Bio-Tek)
- H₂O libre de ARNasas (Sigma)
- Isopropanol (Sigma)
- *Tripure* (Roche)
- *TRIzol* (Invitrogen)

5.- Purificación y cuantificación de ARN

5.1.- Purificación mediante acetato de sodio

Para obtener ARN de mayor pureza las muestras de los tejidos se precipitaron con acetato de sodio y etanol. El ARN extraído se mezclaba con ambos compuestos (por cada 10 volúmenes de muestra 1 volumen de acetato de sodio 3M, pH 5,2, y 27,5 volúmenes de etanol absoluto) y se incubaba a -20°C toda la noche para favorecer la precipitación de los ácidos nucleicos. Seguidamente, se centrifugaba a 14000 g durante 40 min y se descartaba el sobrenadante. Se añadía 1 ml de etanol 75% y se vorteaba hasta ver despegado el precipitado. Finalmente, se centrifugaba a 14000 g durante 15 min y se eliminaba el sobrenadante. El ARN precipitado se resuspendía con el volumen adecuado de agua libre de ARNasas.

Reactivos:

- Acetato de Sodio 3 M (Sigma)
- Etanol absoluto (Panreac)

- H₂O libre de ARNasas (Sigma)

5.2.- Purificación mediante Quiagen RNeasy Mini Kit spin columns o MicroElute RNA Clean Up Kit

Las muestras de PBMC se purificaron utilizando *Quiagen RNeasy Mini Kit spin columns* o *MicroElute RNA Clean Up Kit*. El protocolo de purificación con las columnas de *Quiagen RNeasy Mini Kit spin* se basaba en unir específicamente el ARN a una columna de sílica, y eluir así las impurezas. El primer paso consistía en ajustar el volumen de la muestra a 100 µl con agua libre de ARNasas, añadir 350 µl del *Buffer RLT*, administrado por el kit, y 250 µl de etanol absoluto. Esta mezcla se transfería en las columnas *RNeasy Mini spin* ajustadas en un tubo colector y se centrifugaba a 8000 g durante 15 seg. Seguidamente se descartaba el eluido y se añadían 500 µl de *Buffer RPE*, proporcionado por el kit, y se centrifugaba a 8000 g durante 15 seg. Este lavado se repetía y se centrifugaba a 8000 g durante 2 min. Finalmente se volvía a centrifugar con un nuevo tubo colector a máxima velocidad durante 1 min y se eluía el ARN en un *ependorf* con el volumen de agua libre de ARNasas adecuado.

El protocolo de purificación del kit *MicroElute RNA Clean Up* se basa, al igual que el anterior, en limpiar el ARN extraído previamente mediante unas columnas de sílica que retienen el ARN específicamente. En primer lugar se ajustaba el volumen de la muestra a 100 µl con agua libre de ARNasas y se añadían 350 µl del *QVL Lysis Buffer* y 250 µl de etanol absoluto. Esta mezcla, previamente agitada, se transfería en las columnas *HiBind RNA MicroElute* insertadas en un tubo colector y se centrifugaba a 10000 g durante 15 seg. Seguidamente se descartaba el eluido y se añadían 500 µl de *RNA Wash Buffer II*, proporcionado por el kit, y se centrifugaba a 10000 g durante 30 seg. Este lavado se repetía y se centrifugaba a 13000 g durante 2 min. Finalmente se volvía a centrifugar con un nuevo tubo colector a máxima velocidad durante 5 min y se eluía el ARN en un *ependorf* con 15 µl el agua DEPC proporcionada por el kit.

Reactivos:

- *Quiagen RNeasy Mini Kit spin columns* (Qiagen)
- *MicroElute RNA Clean Up Kit* (Omega Biotek)
- H₂O libre de ARNasas (Sigma)

5.3.- Cuantificación y prueba de estado del ARN total

El ARN total de las muestras se cuantificaba mediante espectrofotometría utilizando el espectrofotómetro *NanoDrop ND-1000*, capaz de determinar la concentración de 1 µl de muestra con gran reproducibilidad y precisión. El análisis de la concentración de la muestra, en ng/µl, se basa en la absorbancia a 260 nm, y se determina mediante la ley de *Beer-Lambert*. El *NanoDrop ND-1000* también determina el ratio 260/280 y 260/230. El ratio 260/280 indica la pureza del ARN, manifestando el grado de contaminación por proteínas; concretamente, un ratio de aproximadamente 2,0 es indicador de un ARN puro, sin embargo un ratio mayor a 2 indica contaminación por ADN. El ratio 260/230 indica el grado de contaminación por solventes orgánicos, y en muestras de ARN puro se encuentra entre 2,0 y 2,2. La determinación se realizó con una cantidad de 2 a 1,5 µl de las muestras.

La integridad del ARN se verificaba mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%. La electroforesis en gel se basa en separar por tamaño los ácidos

nucleicos. En la electroforesis de ARN total se pueden observar dos bandas, una correspondiente al 18 S ARNr y otra al 28 S ARNr. La banda correspondiente al 28 S es el doble que la del 18 S (2:1). Sin embargo si el ARN presenta degradación, la proporción entre las dos bandas se pierde y aparecen bandas intermedias, sobretodo en la parte inferior, que indican la fragmentación de la cadena de ARN. El gel de agarosa se realiza utilizando 0,5X del tampón de electroforesis (Tampón formado por Tris, borato y EDTA), teñido con *SYBER Safe DNA Gel Stain* (1 µl de *SYBER Safe DNA Gel Stain* por cada 10 ml del tampón de electroforesis 0,5X). Para realizar la electroforesis en gel se utilizaron 250 ng de ARN mezclados con 3 µl de tampón de carga. La electroforesis se realizó a 80V durante 30 min. El *Syber Safe DNA Gel Stain* presenta la máxima excitación a 280 y 502 nm y la máxima emisión a 530 nm, por ello se visualizó el gel en un transiluminador de UV (ChemiGenius Bio), y la detección de la imagen se realizó utilizando GeneSnap Software.

Reactivos:

- Agarosa (Pronadisa)
- H₂O libre de ARNasas (Sigma)
- *SYBER Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen)
- Tampón de carga: 50% de glicerol (Sigma), 50% de agua, 2,5 mg/ml de azul de bromofenol (Panreac)
- Tampón de electroforesis 0,5X, formado mediante Tris, borato y EDTA. 44,5 mM de Tris base, 44,5 mM ácido bórico y 1 mM de EDTA.

6.- Análisis de RT-PCR a tiempo real

Con el fin de determinar los niveles de expresión de los genes seleccionados, primero retrotranscribimos el ARN de las muestras de interés a ADNc y posteriormente lo amplificamos y cuantificamos.

6.1.- Retrotranscripción

6.1.1.- Retrotranscripción para muestras de TAB, TAM, hígado, hipotálamo y músculo

- Para la determinación de ARNm de las muestras de TAB, TAM, hígado, hipotálamo y músculo, la reacción de retrotranscripción (RT) era la siguiente: 250 ng de ARN total en un volumen de 5 µl con agua libre de ARNasas y se desnaturalizaba a 65°C durante 10 min en el termociclador Perkin Elmer 2720. Seguidamente se añadían 7,5 µl de RT-mix que contenía para cada tubo de reacción: 1,25 µl de Buffer 10x, 1,25 µl de MgCl₂ 25 mM, 2 µl de dNTPs 2,5 mM, 0,5 µl de *random hexamers* 50 µM, 0,5 µl de inhibidores de ARNasas 20 U/µl, 0,5 µl de transcriptasa reversa (MuLV RT, *murine leukemia virus reverse transcriptase*) 50 U/µl, y 1,5 µl de agua libre de ARNasas. Las condiciones de la reacción eran: 15 min a 20°C, 30 min a 42°C, un paso final de 5 min a 95°C e indefinidamente a 4°C.

Reactivos:

- Buffer 10x (Promega)
- H₂O libre de ARNasas (Sigma)
- Inhibidores de ARNasas 20 U/µl (Applied Biosystems)
- MgCl₂ 25 mM (Promega)

- *Random hexamers* 50 µM (Applied Biosystems)
- Solución de dATP 100 mM (Invitrogen)
- Solución de dCTP 100 mM (Invitrogen)
- Solución de dGTP 100 mM (Invitrogen)
- Solución de dTTP 100 mM (Invitrogen)
- Transcriptasa reversa (MuLV RT, *murine leukemia virus reverse transcriptase*) 50 U/µl (Applied Biosystems)

6.1.2.- Retrotranscripción para muestras de PBMC

Para la determinación de ARNm de las muestras de PBMC, la reacción de RT era la siguiente: 80-250 ng de ARN total en un volumen de 5 µl con agua libre de ARNasas y se desnaturalizaba a 90°C durante 1 min en el termociclador Perkin Elmer 2720. Seguidamente se añadían 5 µl de RT-mix que contenía para cada tubo de reacción: 1 µl de Buffer 10x, 1 µl de MgCl₂ 25 mM, 2 µl de dNTPs 2,5 mM, 1 µl de *random hexamers* 50 µM, 0,5 µl de inhibidores de ARNasas 20 U/µl, y 0,5 µl de transcriptasa reversa (MuLV RT, *murine leukemia virus reverse transcriptase*) 50 U/µl. Las condiciones de la reacción eran: 1 h a 42°C, un paso final de 5 min a 99°C e indefinidamente a 4°C.

Para algunos de los estudios de PBMC (aquellos con limitación de muestra) se ha utilizado también el *iScript cDNA synthesis kit*. En cada tubo de reacción se añadían 50 ng de ARN total en un volumen de 15 µl con agua libre de ARNasas y 5 µl de mix, proporcionada por el kit. Las condiciones de la reacción eran: 5 min a 25°C, 30 min a 42°C, un paso final de 5 min a 85°C e indefinidamente a 4°C, en el termociclador Perkin Elmer 2720.

Reactivos:

- Buffer 10x (Promega)
- H₂O libre de ARNasas (Sigma)
- Inhibidores de ARNasas 20 U/µl (Applied Biosystems)
- *iScript cDNA synthesis kit* (Bio-Rad)
- MgCl₂ 25 mM (Promega)
- *Random hexamers* 50 µM (Applied Biosystems)
- Solución de dATP 100 mM (Invitrogen)
- Solución de dCTP 100 mM (Invitrogen)
- Solución de dGTP 100 mM (Invitrogen)
- Solución de dTTP 100 mM (Invitrogen)
- Transcriptasa reversa (MuLV RT, *murine leukemia virus reverse transcriptase*) 50 U/µl (Applied Biosystems)

6.2.- PCR a tiempo real

En este caso utilizábamos 2 µl del producto de RT (diluido 1/5-1/20, dependiendo de la abundancia del ARNm de interés). A la muestra se añadían 9 µl de PCR-mix que contenía: 3,1 µl de agua libre de ARNasas, 0,45 µl de cada primer (a la concentración de 2,5 a 10 µM) y 5 µl de una mix comercial *Power SYBR Green PCR Master Mix*. La reacción de PCR tenía lugar en el termociclador (StepOnePlus™) y consistía en una desnaturalización de 10 min a 95°C (condiciones necesarias para la activación de la mix comercial), seguido de 40 ciclos de temperaturas: 15 seg a 95°C

(desnaturalización) y 1 min a 60°C (elongación, en algunos casos se ha modificado la temperatura para mejorar este proceso), y una curva final de desnaturalización para verificar la pureza de los productos obtenidos, que consistía en: 15 seg a 95°C, 1 min a 60°C y 15 seg a 95°C. La expresión relativa de cada ARNm se calculaba como porcentaje respecto el grupo control, usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2001).

Reactivos:

- H₂O libre de ARNasas (Sigma)
- *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems)
- *Forward and reverse primers* (Sigma)

7.- Cuantificación de lípidos hepáticos

La determinación de los lípidos hepáticos se realizó mediante el método de Folch (Folch et al., 1957). Para ello se homogenizaron con un *Potter-Envelheim* 0,4 g de tejido con 5 ml de cloroformo:metanol (2:1). Seguidamente se filtraba el homogenizado con papel de filtro en tubos de *Folch* y se limpiaba el Potter y el filtro con 2 ml de cloroformo:metanol cada uno. Finalmente se ajustaba el volumen de cada muestra a 10 ml con cloroformo:metanol, se añadían 2 ml de NaCl 0,45% y se agitaba vigorosamente durante 2 min. Se centrifugaba a 2000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente, y se formaban dos fases: una inferior de cloroformo y lípidos y una superior de agua, metanol e impurezas. La fase acuosa se eliminaba y se enrasaba con metanol puro hasta 10 ml para restablecer la proporción 2:1. Se añadían 2 ml de NaCl 0,9% para limpiar y eliminar impurezas, se agitaba vigorosamente durante 2 min y se centrifugaba otra vez a 2000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Nuevamente, la fase acuosa se eliminaba, se enrasaba con metanol puro hasta 10 ml y se añadían 2 ml de NaCl 0,9% para limpiar y eliminar impurezas. Seguidamente se agitaba vigorosamente durante 2 min y se centrifugaba a 2000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente, se eliminaba la fase acuosa y se enrasaba hasta 10 ml con cloroformo:metanol. 4,5 ml de extracto de cada muestra se distribuía en dos viales previamente secos y pesados (peso vial vacío). Finalmente, estos viales con el extracto se almacenaban a 60°C durante un día y se pesaban (peso vial lleno).

Los cálculos para determinar los lípidos del hígado son:

Gramos de grasa: (Peso vial lleno- peso vial vacío) / 4,5 ml de extracto

Gramos de grasa/ gramos de tejido: (Gramos de grasa/ml) * (10 ml / peso del tejido homogenizado en gramos)

Reactivos:

- Cloroformo:metanol (2:1):
 - o Cloroformo (Panreac) 200 ml y Metanol (Panreac) 100 ml
- Metanol (Panreac)
- NaCl 0,45%
 - o En 250 ml de agua miliQ, 1,125 g de NaCl (Sigma)
- NaCl 0,9%
 - o En 250 ml de agua miliQ, 2,25 g de NaCl (Sigma)

8.- Determinación de glucosa circulante

Las determinaciones de la glucosa se realizaron mediante el glucómetro *Accu-Chek Aviva system* y las tiras reactivas correspondientes de Roche Diagnostics. La determinación de la glucosa se hizo con sangre procedente de la vena safena o del cuello en el momento de la decapitación. Se depositaba una gota de sangre sobre la muesca amarilla de la tira reactiva y en 5 segundos aparecía la concentración de glucosa (mg/dl) en la pantalla del medidor.

La tira reactiva presenta dos electrodos, electrodo de trabajo y electrodo de referencia. En el electrodo de trabajo tiene lugar la oxidación enzimática de la glucosa procedente de la sangre, mediante la glucosa deshidrogenasa, produciéndose ácido glucónico. Durante la oxidación de la glucosa, el enzima se reduce temporalmente por dos electrones procedentes de la glucosa. El enzima reducido transfiere dos electrones a dos mediadores oxidados de ferricianide formando ferrocianide. El glucómetro determina el voltaje del electrodo de trabajo, electrodo donde se transfieren los electrones del mediador ferrocianide, permitiendo así calcular la glucosa presente en sangre.

Reactivos:

- *Accu-Chek Aviva system* (Roche diagnostics)
- Tiras reactivas *Accu-Chek Aviva system* (Roche diagnostics)

9.- Test de tolerancia oral a la glucosa

En los animales alimentados con las diferentes dietas hiperlipídicas se realizó la prueba de tolerancia oral a la glucosa para evaluar la sensibilidad a la insulina. La prueba consistía en administrar oralmente (mediante canulación) de 1 a 1,5 ml de glucosa (1,5 g/Kg de peso corporal), después de un ayuno nocturno de 12 horas. Se determinó la concentración de glucosa en sangre a tiempo 0 y a partir de los 30, 60, 120 y 180 min, mediante una punción en la vena safena de la pata. La concentración de glucosa se determinaba utilizando un glucómetro *Accu-Chek Aviva system*. Finalmente, para determinar la tolerancia oral a la glucosa se calculó el área bajo la curva mediante el método trapezoidal (Sánchez et al., 2008).

Reactivos:

- *Accu-Chek Aviva system* (Roche diagnostics)
- Tiras reactivas *Accu-Chek Aviva system* (Roche diagnostics)
- D-glucosa (Merck)

10.- Determinación de insulina circulante

La determinación de insulina en suero de rata se realizó mediante un kit de inmunoensayo enzimático, con *Rat Insulin ELISA*. Esta técnica se basa en la técnica de sándwich directa, en la cual durante la incubación, la insulina presente en la muestra reacciona con los anticuerpos anti-insulina unidos a la placa y con los anticuerpos anti-insulina conjugados con peroxidasa, y el conjugado reacciona con el substrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), dando color detectable mediante espectrofotometría.

El protocolo se basaba en añadir a cada pocillo 25 µl de suero o de patrón de concentración conocida y 50 µl de *enzyme conjugate 1X*, previamente preparado a partir del *enzyme conjugate 11X* proporcionado por el kit. Se incubaba en agitación durante 2 h a temperatura ambiente. Pasadas las 2 h se lavaba con *Wash Buffer 1X*, 6 veces, se añadían 200 µl de *Substrate TMB*, y se incubaba 15 min a temperatura ambiente. Finalmente, se añadía *Stop solution*, proporcionada por el kit, y se leía la absorbancia a 450 nm, en un espectrofotómetro para placas de ELISA *Sunrise* de TECAN.

Reactivos:

- *Rat Insulin ELISA* (Merckodia)

11.- Determinación del índice HOMA-IR

La resistencia a la insulina se determinó mediante la evaluación del modelo homeostático de resistencia a la insulina (HOMA-IR). Este índice se determinó a partir de las concentraciones de insulina y glucosa en condiciones de ayuno utilizando la fórmula definida por Matthews et al. (Matthews et al., 1985).

La fórmula para la determinación del índice HOMA-IR es:

HOMA-IR: glucosa en ayuno (mM/l) * insulina en ayuno (mU/l) / 22.5

12.- Determinación de leptina circulante

La leptina circulante se determinó mediante el kit de inmunoensayo enzimático, *Quantikine Mouse Leptin Immunoassay*. En cada pocillo, recubierto por un anticuerpo policlonal anti-leptina, suministrados por el kit, se introducían 50 µl de suero (previamente diluido) y los diferentes puntos del patrón de concentración conocida, y se incubaba 2 h a temperatura ambiente. Seguidamente, se hacían 5 lavados con 400 µl de *Wash Buffer*, suministrado por el kit, se añadían 100 µl de conjugado anti-leptina, proporcionado por el kit, y se incubaba 2 horas a temperatura ambiente. Pasadas las 2 h de incubación, se hacía 5 lavados con 400 µl de *Wash Buffer*, suministrado por el kit, se añadía 100 µl de *Substrate Solution*, y se incubaba 30 min a temperatura ambiente con protección de la luz. Finalmente, se añadían 100 µl de *Stop Solution*, administrada por el kit, y se leía la placa a 450 nm, en un espectrofotómetro para placas de ELISA *Sunrise* de TECAN.

Reactivos:

- *Quantikine Mouse Leptin Immunoassay* (DRG Diagnostics)

13.- Determinación de ácidos grasos libres circulantes

La determinación de los NEFA en plasma se realizó con el test colorimétrico enzimático *NEFA-HR2*. El fundamento del test colorimétrico para la cuantificación de los NEFA en suero consiste en la acilación de la coenzima A por los ácidos grasos en la presencia de acil coenzima A sintetasa (ACS, *Acyl-coenzyme A synthetase I*). El acil-CoA producido de este modo se oxida mediante la enzima ACOX, generando peróxido de hidrógeno, en presencia de una peroxidasa, que permite la condensación oxidativa de 3-metil-N-etil-N (β -hidroxietil) anilina con 4-aminoantipirina formándose un aducto de color púrpura que se puede medir colorimétricamente a 550 nm.

En placas de ELISA (96 pocillos) se pipetearon 7 μ l de la muestra o de los puntos del patrón de concentración conocida, se añadían 150 μ l del reactivo 1, proporcionado por el kit, y se incubaba durante 5 min a 37°C. Seguidamente se añadían 75 μ l del reactivo 2, proporcionado por el kit, se mezclaba y se incubaba 5 min a temperatura ambiente. Finalmente se leía la absorbancia a 550 nm, utilizando un espectrofotómetro para placas de ELISA *Sunrise* de TECAN.

Reactivos:

- Kit colorimétrico enzimático *NEFA-HR2* (Wako)

14.- Determinación de triglicéridos circulantes

La determinación de los triglicéridos en suero se realizó con el *Serum Triglyceride Determination Kit*, basado en la acción de la lipoproteína lipasa sobre los triglicéridos presentes en la muestra, produciéndose glicerol y ácidos grasos. El glicerol formado sufre una serie de reacciones enzimáticas (fosforilación, oxidación y peroxidación) que producen quimioluminiscencia con absorbancia a 540 nm.

En placas de ELISA (96 pocillos) se pipeteaban 240 μ l de *Free Glycerol Reagent*, proporcionado por la casa comercial, 3 μ l de suero o de los puntos del patrón de concentración conocida, y se incubaba durante 5 min a 37°C. Seguidamente se leía la absorbancia a 540 nm, mediante un espectrofotómetro para placas de ELISA *Sunrise* de TECAN, determinándose así la concentración de glicerol en el suero. Se añadían 60 μ l de *Triglyceride Reagent*, proporcionado por el kit, se mezclaba y se incubaba durante 5 min a 37°C. Finalmente, se leía la absorbancia a 540 nm, para determinar la concentración de triglicéridos totales, de manera que la concentración de triglicéridos reales se obtenía mediante la resta entre triglicéridos totales y el glicerol.

Reactivos:

- *Serum Triglyceride Determination Kit* (Sigma)

15.- Análisis histológico del hígado y TAB

Fragmentos de hígado y TAB frescos de rata se fijaban por inmersión con paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1 M toda la noche a 4°C. Una vez lavadas las muestras dos veces con tampón fosfato 0,1 M, se deshidrataban incubándolas con soluciones graduales de etanol (75, 90 y finalmente en etanol al 100%), y xileno. Las muestras se incluían en parafina y se dejaban solidificar en bloques a temperatura ambiente. Seguidamente, los tejidos se cortaban con un micrótopo en secciones de 5 μ m de grosor y se teñían con una solución de hematoxilina-eosina durante 5 min. Posteriormente, se obtenían las imágenes con un

microscopio óptico, asociado una cámara digital, y se analizaban con el programa *Axio Vision software*. Las imágenes se estudiaban para la identificación de evidencias de esteatosis en muestras de hígado y para detectar la presencia de adipocitos multiloculares (marrones/*brite*) en las muestras de TAB analizadas.

Reactivos:

- AxioVision 40V 4.6.3.0 Software (Carl Zeiss, S.A.)
- Eosina (Panreac)
- Etanol absoluto (Panreac)
- Hematoxilina (Panreac)
- Parafina (Sigma)
- Paraformaldehído (Sigma)
- Tampón fosfato 0,1 M (Tampón fosfato 0,2 M diluido 1:1 con agua destilada)
 - o Tampón fosfato 0,2 M pH 7,2 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Panreac) 3,25 g y Na_2HPO_4 (Panreac) 11,24 g, en 1 l)
- Xileno (Panreac)

16.- Análisis inmunohistoquímico de tejidos

Se determinó la presencia de adipocitos propios del tejido adiposo retroperitoneal inmunopositivos para UCP1 y CIDE-A, mediante el método avidina-biotina-peroxidasa (Hsu et al., 1981).

Secciones seriadas de 5 μm se incubaron en PBS con un 2% de suero de cabra a un pH de 7,3 con el fin de bloquear todos los sitios inespecíficos y, posteriormente, con el anticuerpo primario de conejo policlonal anti-UCP1 (diluido de 1:200 a 1:300 en PBS) y anti-CIDE-A (diluido 1:150 en PBS). Seguidamente, las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado, anti-IgG de conejo (diluido 1:200 en PBS) y finalmente con el complejo ABC. El conjugado con actividad peroxidasa reaccionaba con el substrato *Sigma Fast 3,3'-diaminobenzidine*. Finalmente, las secciones se contratiñeron con hematoxilina y se montaron con el medio de montaje *Eukitt*. Las imágenes se obtuvieron con el microscopio óptico *Zeiss Axioskop 2* equipado con una cámara digital, y se analizaron con el programa *Axio Vision software*.

Reactivos:

- Anticuerpo secundario anti IgG de conejo biotinilado (Vector Laboratories,)
- AxioVision 40V 4.6.3.0 Software (Carl Zeiss, S.A.)
- Complejo ABC (Vectastain ABC kit, Vector)
- Anticuerpo anti-CIDE-A (Sigma)
- Eukitt (Kindler)
- *Sigma Fast 3,3'-diaminobenzidine* (Sigma-Aldrich)
- Anticuerpo anti-UCP1 (GeneTex International Corporation)

17.- Análisis estadístico

El análisis estadístico se eligió en función del objetivo experimental de cada manuscrito. Para estudiar las diferencias individuales entre los grupos experimentales, con comparaciones múltiples, se aplicó el análisis de varianzas de uno o dos factores (ANOVA). Las comparaciones simples (dos grupos experimentales) se realizaron mediante *Student's t test*. En algunos casos donde se estudiaron las relaciones entre

diferentes variables utilizamos correlación de Pearson. El programa utilizado ha sido SPSS para Windows (SPSS versión 19.0). En todos los casos el nivel de confianza considerado era del 95% ($p < 0,05$), y se indicaba cuando era diferente.

Capítulo IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Manuscrito 1/Manuscript 1

**Peripheral blood mononuclear cells: a potencial source of homeostatic imbalance
markers associated with obesity development**

Oliver, P., **Reynés, B.**, Caimari, A., Palou, A.

Pflügers Archiv- European Journal of Physiology **465**(4):459-68, 2013

Title page

Title: Peripheral blood mononuclear cells: a potential source of homeostatic imbalance markers associated with obesity development

Authors: Paula Oliver^{1*}, Bàrbara Reynés¹, Antoni Caimari^{1,2}, Andreu Palou¹

Affiliation: ¹Laboratory of Molecular Biology, Nutrition and Biotechnology, Universitat de les Illes Balears and CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERObn), Palma de Mallorca, Spain; ²Centre Tecnològic de Nutrició i Salut (CTNS), TECNIO, CEICS, Reus, Spain

Address correspondence to: Dr. Paula Oliver, Laboratory of Molecular Biology, Nutrition and Biotechnology, Universitat de les Illes Balears. Cra. Valldemossa Km 7.5. E-07122-Palma de Mallorca, Spain. Phone: +34 971172548. Fax: +34 971173426. E-mail: paula.oliver@uib.es

Running title: PBMC as a source of homeostatic imbalance markers

Author contribution: Paula Oliver and Andreu Palou conceived the experiment. Bàrbara Reynés did the major part of the experimental work and Antoni Caimari performed the animal procedures and was involved in experimental work. Paula Oliver wrote the article and Andreu Palou participated in critical revising of the manuscript. All authors revised and approved the final manuscript.

Acknowledgements: Supported by the Instituto de Salud Carlos III, Centro de Investigación Biomédica en Red Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, CIBERObn. This work was also supported by the Spanish Government (Ministry of Education and Science, AGL 2009-11277/ALI) and the European Union (BIOCLAIMS FP7-244995). Our laboratory is a member of the European Research Network of Excellence NuGO (The European Nutrigenomics Organization, EU Contract: FOOD-CT-2004-506360 NUGO).

Conflict of interest: None

1.- Abstract

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) have a great potential for nutrition and obesity studies. PBMC reflect the nutritional response of key organs involved in energy homeostasis maintenance, which is altered in the obese state. Here, we aimed to determine the usefulness of PBMC as a source of early markers of obesity. To that purpose, we analysed whether PBMC could reflect the insensitivity to changes in feeding conditions associated with obesity during the development of this pathology. Expression of key genes central to energy metabolism was measured by RT-PCR in PBMC samples of normoweight (control) and cafeteria-fed (obese) rats in feeding, fasting and refeeding conditions. Samples were obtained monthly from 2 (beginning of cafeteria diet-feeding) to 6 months of age. In general terms, expression of genes related to fatty acid synthesis (*Fasn*, *Srebp1*) and adipogenesis (*Ppar γ*) decreased with fasting and increased with refeeding. Conversely, the expression of a key gene regulating beta-oxidation (*Cpt1a*) and the gene for an orexigenic neuropeptide (*Npy*) - in accordance with their metabolic role - increased with fasting and decreased with refeeding. This expression pattern disappeared in obese rats, in which insensitivity to feeding conditions was observed after only 1 month of cafeteria diet-feeding. Thus, during development, PBMC accurately reflect nutritional regulation of energy homeostatic genes and the insensitivity to feeding associated with obesity, even in the earlier stages with a low degree of overweight. For this reason, this set of blood cells could constitute a potential source of biomarkers of early homeostatic imbalance which would be useful in nutrition studies that could help prevent the occurrence of obesity.

2.- Introduction

In response to changes in food intake, adaptations in energy expenditure and fat storage occur to help maintain energy homeostasis and body weight (Korner et al., 2009; Palou et al., 2008). However, in the obese state, mechanisms involved in homeostatic control are impaired and insensitivity in the response to feeding conditions is observed (Caimari et al., 2007, 2008; Pico et al., 2002). Therefore, proper maintenance of energy homeostasis is of extreme importance for survival, and its deregulation can be related to the appearance of obesity (Palou et al., 2008). Due to the multiple health problems related to increased body weight, it would be highly relevant to be able to detect early markers of disturbances in energy homeostasis which could help prevent obesity. In fact, there is increasing interest in the identification of early determinants of adult obesity (Brisbois et al., 2012). Here our objective was to determine the usefulness of a set of blood cells, peripheral blood mononuclear cells (PBMC), as a source to detect early biomarkers of obesity based on their ability to reflect alterations in energy metabolism related to this pathology (Caimari et al., 2010a; Caimari et al., 2010b).

PBMC, which include lymphocytes and monocytes, constitute interesting biological material: they travel through the body reflecting gene expression changes that occur in different tissues in response to internal or external stimuli and can be collected easily and repeatedly with minimum invasion in comparison to sampling of other tissues (Liew et al., 2006). The use of PBMC for the development of diagnostic tools is growing (Bouwens et al., 2008; Brisbois et al., 2012; Burczynski and Dorner, 2006; Chaussabel et al., 2005; Maas et al., 2002; Olsen et al., 2004a; Visvikis-Siest et al., 2007) and they have also been shown to be useful for nutritional studies, reflecting specific effects of diets or nutrients (Aljada et al., 2004; Bouwens et al., 2009; Caimari et al., 2010c; Mohanty et al., 2002; Radler et al., 2011; van Erk et al., 2006), response to fasting (Bouwens et al., 2007; Caimari et al., 2010a; Caimari et al., 2010b) and weight loss due to hypocaloric diets (Crujeiras et al., 2008a; Crujeiras et al., 2008b; de Mello et al., 2008). Moreover, there is a clear association between changes in PBMC gene expression and obesity (Bokarewa et al., 2005; Caimari et al., 2010c; de Mello et al., 2008; Ghanim et al., 2004; Goyenechea et al., 2009b; Napoleone et al., 2007; O'Rourke et al., 2006; Patel et al., 2003; Samara et al., 2008; Tsiotra et al., 2007), and we have previously demonstrated that PBMC can reflect the energy homeostasis adaptations to acute changes in feeding conditions (fasting and refeeding) which occur in key tissues such as liver or adipose tissue, and that this response is altered in obese animals (Caimari et al., 2010a; Caimari et al., 2010b).

In this study, we used PBMC to identify potential biomarkers related to energy homeostasis whose nutritional regulation could be altered during obesity development. To that purpose, we analysed alterations in the response of key energy metabolism-related genes to different feeding conditions (fasting and refeeding) in PBMC of rats fed a cafeteria diet as body weight increased. Specifically, we analysed the expression of genes (mainly involved in lipid metabolism homeostasis) which we have previously described to be regulated in response to acute fasting and refeeding in a similar manner as happens in important energy homeostatic tissues (Caimari et al., 2010a). We selected two genes related to fatty acid synthesis, fatty acid synthase (*Fasn*) and sterol regulatory element-binding protein 1 (*Srebp1*), a gene involved in adipogenesis and lipogenesis, peroxisome proliferator activated receptor gamma (*Pparγ*), and a key gene regulating beta-oxidation, carnitine palmitoyl-transferase 1a (*Cpt1a*). We also studied a gene involved in food intake regulation, neuropeptide Y (*Npy*), coding for an

orexigenic signal. Characterization of impairment in the apparent energy homeostatic control in PBMC, as reflected by the insensitivity to nutritional changes in the energy-related genes studied, could be used to intervene in obesity-prone subjects in an early pre-obese state and thereby prevent the development of obesity.

3.- Methods

3.1.- Animals, diets and experimental design

The animal protocol followed in this study was reviewed and approved by the Bioethical Committee of the University of the Balearic Islands, and University guidelines for the use and care of laboratory animals were followed. Two-month-old male Wistar rats (Charles River Laboratories España, SA, Barcelona, Spain) were divided into two dietary groups for 4 months: control group (n=15) fed with a standard chow diet (Panlab, Barcelona, Spain) and cafeteria group (n=15) fed with a cafeteria diet in addition to the standard chow. Cafeteria diet is a fat-rich hypercaloric diet containing the following foodstuffs: cookies with liver pate and sobrassada (a typical Majorcan sausage), candies, fresh bacon, biscuits, chocolate, salted peanuts, cheese, milk containing 20% (w/v) sucrose and ensaïmada (a typical Majorcan pastry). The cafeteria diet is a well-established model to study obesity; it is a highly palatable hyperlipidic diet that mimics Western diet, inducing voluntary hyperphagia and rapid weight gain in rodents (Caimari et al., 2010c; Sampey et al., 2011). The gross composition of the diets was as follows: for the standard chow diet, 60.5% carbohydrate, 2.9% lipid, 15.4% protein, 12% water, 5.3% minerals and 3.9% fibre, and for the cafeteria diet, 35.2% carbohydrate, 23.4% lipid, 11.7% protein, 28.4% water and 1.31% fibre. The animals were single housed at 22°C with 12 h periods of light or dark. Each group of rats was divided into three subgroups submitted to different feeding conditions (n=5 for each condition): feeding (animals provided with *ad libitum* access to diet), fasting (animals deprived of food for 14 h) and refeeding (fasted animals with subsequent free access to diet for 6 h). Coprophagy was prevented by changing the cage immediately prior to food deprivation. Water was offered *ad libitum* and body weight was followed twice a week.

Prior to administering the cafeteria diet (age 2 months) and thereafter every month until rats were 6 months old, blood samples (1.5-2.5 ml) were collected in the different feeding conditions (feeding, fasting and refeeding) from the saphena vein, using heparin in NaCl (0.9%) as anticoagulant. Immediately after blood collection, PBMC were isolated by Ficoll gradient separation, according to the instructions indicated by the manufacturer (GE Healthcare Bio Sciences, Barcelona, Spain), with some modifications (Caimari et al., 2010c).

At the age of 6 months rats were killed in the experimental feeding conditions studied (feeding, fasting and refeeding) and different white adipose tissue depots – epididymal, inguinal, mesenteric and retroperitoneal – were removed and weighed to determine the adiposity index, and then immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C for analysis. Liver samples were also harvested and stored at -70°C for gene expression studies. However liver mRNA was degraded and, for that reason, the liver gene expression data presented in this work come from another set of animals submitted to the same experimental protocol (control and cafeteria group) and which were sacrificed under two different feeding conditions: *ad libitum* feeding and 14-h fasting (n=6 animals per condition); refeeding conditions were not studied in this case. Truncal blood was collected from the neck, stored at room temperature for 1 h and overnight at 4°C, and was then centrifuged at 1000 g for 10 min to collect the serum.

3.2.- Adiposity index

Adiposity was determined as an adiposity index computed for each rat as the sum of epididymal, inguinal, mesenteric and retroperitoneal white adipose tissue depot weight and expressed as a percentage of total body weight.

3.3.- Quantification of circulating insulin, leptin, and glucose levels

Serum insulin and leptin levels were measured using enzyme-linked immunosorbent assay kits (from DRG Instruments, Marburg, Germany, and R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), and blood glucose using an Accu-Chek Glucometer (Roche Diagnostics, Barcelona, Spain).

3.4.- Homeostatic model assessment for insulin resistance analysis

Insulin resistance was assessed by the homeostatic model assessment for insulin resistance (HOMA-IR) in rats submitted to overnight (14 h) fasting (n=5 for all groups). HOMAR-IR score was calculated from fasting insulin and glucose concentrations using the formula of (Matthews et al., 1985). $HOMA-IR = \text{fasting glucose (millimoles per liter)} \times \text{fasting insulin (milliunits per liter)}$.

3.5.- Total RNA isolation

Total RNA from PBMC samples was extracted using Tripure reagent (Roche Diagnostics Barcelona, Spain) and purified with Quiagen RNeasy Mini Kit spin columns (Izasa, Barcelona, Spain). RNA yield was quantified on a NanoDrop ND 1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Total RNA from retroperitoneal adipose tissue was extracted using Tripure reagent, and RNA from liver samples was extracted using EaZy Nucleic Acid Isolation Kit E.Z.N.A.TM (Omega Bio-Tek, Vermont, USA). RNA integrity was confirmed using agarose gel electrophoresis.

3.6.- Real-time reverse transcriptase PCR analysis

Real-time PCR (RT-PCR) was performed to determine mRNA expression levels of key energy metabolism genes: fatty acid synthase (*Fasn*), sterol regulatory element-binding protein 1 (*Srebp1*), peroxisome proliferator activated receptor gamma (*Pparγ*), carnitine palmitoyl-transferase 1a (*Cpt1a*) and neuropeptide Y (*Npy*), in PBMC from blood collected in control and cafeteria-fed Wistar rats at different ages (from 2 to 6 months) and in the different feeding conditions studied (feeding, fasting and refeeding). In addition, at the age of 6 months, mRNA expression of these genes (except for *Npy*) was also measured in samples of retroperitoneal adipose tissue in feeding, fasting and refeeding conditions and in liver samples of fed and fasted animals. For adipose tissue and liver we only analysed gene expression at the end of the experimental period (6 months of age) because doing it at different times would require the use of a high number of animals.

An amount of 0.25 µg of total RNA was denatured at 90°C for 1 min and then reverse transcribed to cDNA using MuLV reverse transcriptase (Applied Biosystems, Madrid, Spain) at 42°C for 1 h, with a final step of 5 min at 99°C in an Applied

Biosystems 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Madrid, Spain). Each PCR was performed from diluted (1/5 for PBMC, 1/20 for retroperitoneal adipose tissue and liver) cDNA template, forward and reverse primers (10 μ M each), and Power SYBER Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Madrid, Spain) in a total volume of 11 μ l, with the following profile: 10 min at 95°C, followed by a total of 40 temperature cycles (15 s at 95°C and 1 min at 60°C) with a final cycle of 15 s at 95°C, 1 min at 60°C and 15 s at 95°C. In order to verify the purity of the products, a melting curve was produced after each run according to the manufacturer's instructions (Applied Biosystems, Madrid, Spain). The threshold cycle (Ct) was calculated by the instrument's software (StepOne Software v2.0, from Applied Biosystems) and the relative expression of each mRNA was calculated as a percentage of control rats, using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (Livak and Schmittgen, 2001). Data were normalized against the housekeeping gene guanosine diphosphate dissociation inhibitor 1 (*Gdi1*) which we have previously identified as a good constitutive gene based on microarray studies (Caimari et al., 2010a). *Gdi1* was used as a reference gene for all the samples except for PBMC from 2-month-old rats, a time-point at which β -actin was a better constitutive gene. Primers for the different genes are described in Table 1, and all were obtained from Sigma Genosys (Sigma Aldrich Química SA, Madrid, Spain).

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Amplicon size (bp)
<i>Cpt1a</i>	GCTCGCACATTACAAGGACAT	TGGACACCACATAGAGGCAG	250
<i>Fasn</i>	CGGCGAGTCTATGCCACTAT	ACACAGGGACCGAGTAATGC	222
<i>Npy</i>	TGGACTGACCCCTCGCTCTAT	GTGTCTCAGGGCTGGATCTC	188
<i>Pparg</i>	AGAGCCTTCAAACCTCCCTCA	GAGACATCCCCACAGCAAG	230
<i>Srebfl</i>	CCCACCCCTTACACACC	GCCTGCGGTCTTCATTGT	198
<i>Gdi1</i> (reference gene)	CCGCACAAGGCAAATACATC	GACTCTCTGAACCGTCATCAA	159
β -actin (reference gene)	TACAGCTTACCACCACAGC	TCTCCAGGGAGGAAGAGGAT	164

Table 1. Nucleotide sequences of primers used for RT-PCR amplification and size of the PCR products.

3.7.- Statistical analysis

All data are expressed as the mean \pm SEM. Differences between groups were analysed using two or one-way ANOVA or Student's *t* test. LSD post-hoc test was used after ANOVA analysis. The specific statistical analysis used for each comparison is specified in the footnotes of the Tables and Figures. Analyses were performed with SPSS® for windows (SPSS, Chicago, IL). Threshold of significance was defined at $p < 0.05$ and is indicated when different.

4.- Results

4.1.- Body weight, adiposity and circulating parameters

Data of body weight, adiposity and circulating parameters have been previously described in the same cohort of animals (Caimari et al., 2010a). Briefly, a progressive increase in body weight was observed in the cafeteria-fed animals: 13, 20 and 26% increase in weight compared to controls after 1, 2 and 3 months of cafeteria diet feeding. At the end of the experiment (4 months of diet) cafeteria-fed animals attained 29% increased body weight (645 ± 20 vs. 500 ± 15 g in cafeteria-obese vs. control rats) and a higher adiposity index compared with animals of the control group (17.5 ± 0.9 vs. $7.95 \pm 0.86\%$). These animals were hyperleptinemic (38.0 ± 4.9 vs. 10.7 ± 1.8 pg/ μ l) and had greater blood glucose levels in the fed state (6.41 ± 0.39 vs. 5.18 ± 0.22 mM), although circulating insulin levels were not affected (3.44 ± 0.98 vs. 3.23 ± 0.46 μ g/l). HOMA-IR score was increased in cafeteria-obese rats suggesting reduced insulin sensitivity, although the increase was non-significant due to inter-individual variations in the cafeteria group ($11.0 \pm 4.9\%$ vs. $5.25 \pm 1.52\%$). Feeding conditions (feeding, fasting and refeeding) affected circulating insulin and leptin levels, but not glucose levels. As a general tendency, circulating insulin and leptin levels decreased after 14-h fasting and were recovered after refeeding, although the decrease in insulin levels with fasting was only significant in control animals and the recovery of leptin after refeeding in cafeteria-fed animals (Caimari et al., 2010a).

The liver samples used for gene expression analysis present in this work were from another set of animals submitted to the same experimental protocol (control and cafeteria group) and sacrificed under two different feeding conditions: *ad libitum* feeding and 14-h fasting. These animals presented similar characteristics to the previous animals: cafeteria-fed rats attained 32% body weight at the end of the experiment (677 ± 50 vs. 512 ± 18 g in cafeteria-obese vs. control rats) and a higher adiposity index (18.5 ± 2.0 vs. $8.96 \pm 0.95\%$), and were hyperleptinemic (46.7 ± 2.9 vs. 16.5 ± 3.0 μ g/l) and had greater circulating glucose (6.68 ± 0.10 vs. 6.01 ± 0.18 mM) and insulin levels (5.63 ± 0.18 vs. 3.28 ± 0.36 μ g/l) in the fed state. Glucose and insulin levels decreased as a result of 14-h fasting, both in control and cafeteria-fed animals (data not shown).

4.2.- Nutritional response of key genes involved in energy homeostasis in PBMC during obesity development due to the intake of a cafeteria diet

At the age of 2 months, when animals were fed a standard chow diet, all the studied genes were regulated in response to fasting and refeeding as expected according to their metabolic role: there was a decrease in *Fasn* and *Srebp1* expression with 14-h fasting and an increase with 6 h refeeding after fasting, also observed for *Ppar γ* , while there was an increase with fasting for *Cpt1a* and *Npy* (Figure 1). At the age of 3 months, in control animals, gene expression of the studied genes followed the same pattern as the previous month (although statistical significance was not reached in some cases due to greater variability). However, in cafeteria-diet fed animals, after 1 month of cafeteria-diet feeding (13% increased body weight), nutritional regulation was not observed, indicating insensitivity to feeding conditions at this early stage of overweight. It is worth noting a clear increase in *Srebp1* gene expression after refeeding in cafeteria-obese animals that was not observed in control animals. The same nutritional behaviour was observed at the ages of 4 months and 6 months, when animals had 20% and 29% increased body weight respectively: there was a decrease

with fasting and an increase with refeeding in the expression of the genes involved in fatty acid synthesis (*Fasn* and *Srebp1*), and an increase with fasting in the expression of the key gene in beta-oxidation, *Cpt1a* and of the orexigenic gene *Npy*, a regulation that was lost in the cafeteria-obese animals. At 6 months of age and contrary to what happened in younger rats, *Fasn* nutritional regulation was not observed in control animals, which could be indicating impairment in response to feeding conditions associated with aging (Caimari et al., 2008; Roth et al., 1981; Yu et al., 1980). No difference was evident in mRNA levels of the studied genes in PBMC when comparing *ad libitum* fed control and cafeteria-obese animals.

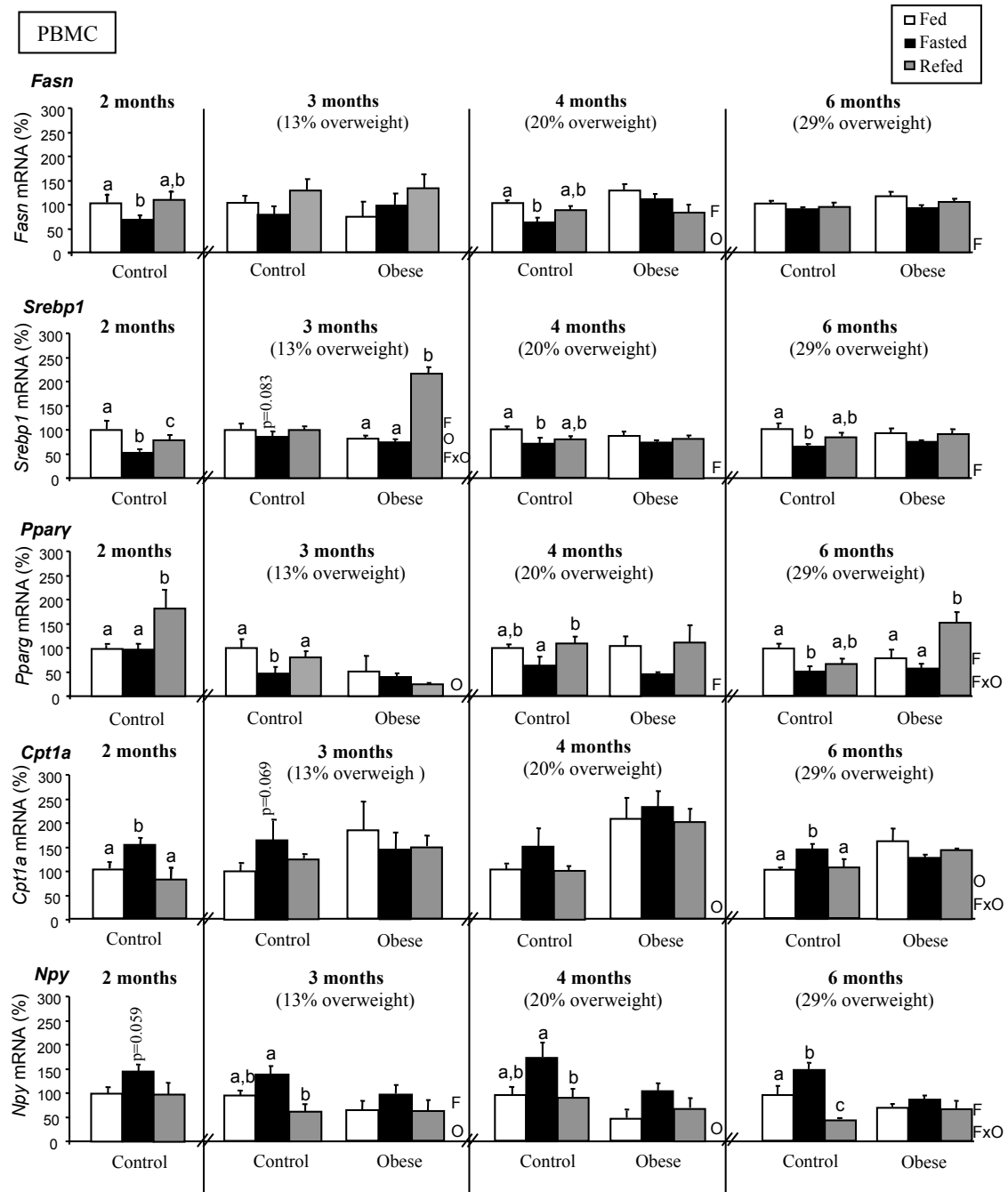


Figure 1. Expression of genes involved in energy homeostasis (*Fasn*, *Srebp1*, *Pparg*, *Cpt1a* and *Npy*) in PBMC of control and obese Wistar rats at different ages submitted to *ad libitum* feeding (fed), 14-h fasting (fasted) and 6-h refeeding after fasting (refed), measured by RT-PCR. Rats were fed a standard chow diet (control) or a cafeteria diet (obese) from 2 to 6 months of age. At 3, 4, 5 and 6 months of age the animals had 13%, 20% and 29% increased body weight (overweight), respectively, compared to controls. Results represent mean \pm SEM (n=5) of ratios of specific mRNA levels relative to *Gdi* or β -*actin*, expressed as a percentage of the value of fed animals in the control group that was set to 100%. A one-way ANOVA taking into account control and obese animals independently was performed. Within control and obese animals, data not sharing a common letter (a, b, c) are significantly different ($p < 0.05$ and indicated when different). LSD post-hoc test was used after ANOVA analysis. Additionally, a two-way ANOVA ($p < 0.05$) was performed considering all the animals and taking into account feeding conditions (F) and obesity (O). For this statistical analysis, F indicates effect of feeding conditions, O effect of obesity induced by cafeteria-diet feeding, and FxO interaction of feeding conditions and obesity induced by cafeteria-diet feeding. [2]

4.3.- Nutritional response of key genes involved in energy homeostasis in liver and adipose tissue of cafeteria-obese rats

Liver and adipose tissue play a key role in energy homeostasis maintenance with well-known nutritional regulation. We were interested in studying whether the gene expression changes in response to fasting and refeeding observed in PBMC in control and cafeteria-obese animals reflect the nutritional adaptations that take place in liver and adipose tissue. We have previously compared nutritional response between PBMC and mesenteric adipose tissue (reported to be especially sensitive to changes in feeding patterns) in 6-month-old control rats (Caimari et al., 2010a). Here, we decided to select the retroperitoneal adipose tissue. In liver, we only studied response to 14-h fasting (not refeeding), because problems with RNA integrity made it necessary to use samples from another set of animals (see “Material and Methods” section).

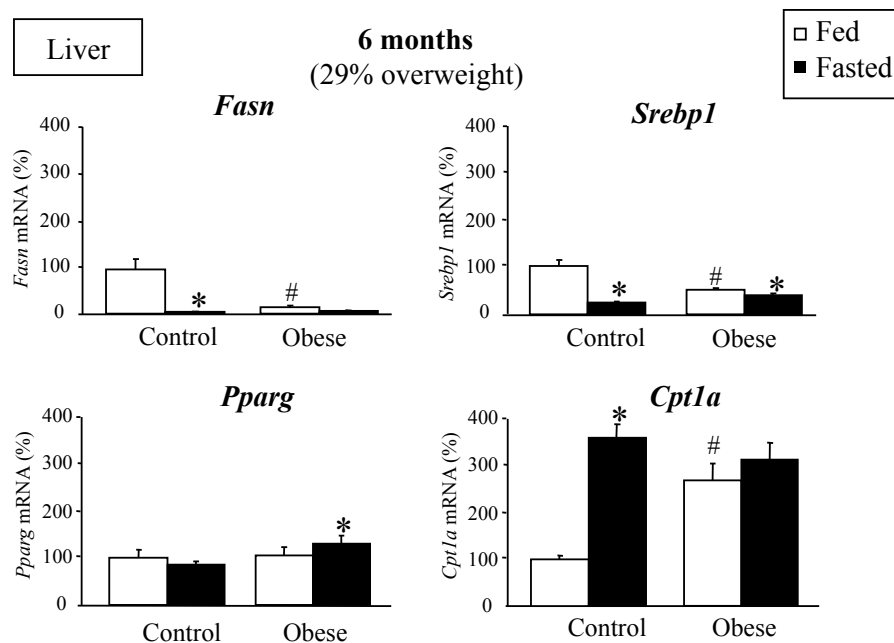


Figure 2. Expression of genes involved in energy homeostasis (*Fasn*, *Srebp1*, *Pparg* and *Cpt1a*) in liver of 6-month-old control Wistar rats and Wistar rats made obese by cafeteria-diet feeding submitted to *ad libitum* feeding (fed) and 14-h fasting (fasted), measured by RT-PCR. Results represent mean \pm SEM (n=6) of ratios of specific mRNA levels relative to *Gdi*, expressed as a percentage of the value of fed animals in the control group that was set to 100%. * Effect of fasting (fasted animals vs. their respective controls) (Student's *t* test, $p < 0.05$). # Effect of obesity induced by cafeteria-diet feeding (obese fed animals vs. their respective controls) (Student's *t* test, $p < 0.05$).

Nutritional regulatory pattern of the studied genes in PBMC was similar to that observed in liver and adipose tissue (retroperitoneal depot). As expected, in control rats there was a decrease with fasting in gene expression of the two lipogenic genes, *Fasn* and *Srebp1*, both in liver and in the retroperitoneal adipose tissue, which was not recovered with 6-h refeeding (studied in adipose tissue). *Fasn* and *Srebp1* nutritional response was lost or impaired in obese animals. In cafeteria-obese rats no decrease was observed with fasting in liver for *Fasn* and the decrease of *Srebp1* was impaired (57% decrease in obese vs. 97% in control rats), neither was a decrease for *Srebp1* observed in adipose tissue (Figures 2 and 3). On the other hand, fasting produced a remarkable increase of *Cpt1a* mRNA levels in liver of control animals (260%) which was not observed in liver of obese rats (Figures 2 and 3). *Cpt1a* was not regulated by

fasting in the retroperitoneal adipose tissue. In control rats, gene expression of the adipogenic *Pparγ* did not respond to fasting either in liver or in adipose tissue (Figures 2 and 3). However, in adipose tissue of obese animals an increase in *Pparγ* expression was observed in the refed condition which was also present in PBMC of the same animals (Figures 1 and 3).

Gene expression of some of the studied genes was altered in *ad libitum* fed animals when comparing control and cafeteria groups. In adipose tissue, *Fasn* and *Srebp1* expression was lower while *Cpt1a* was higher in cafeteria-fed than in control animals (Figure 3). In liver, lower mRNA levels for *Srebp1* were also observed in cafeteria-obese rats (Figure 2).

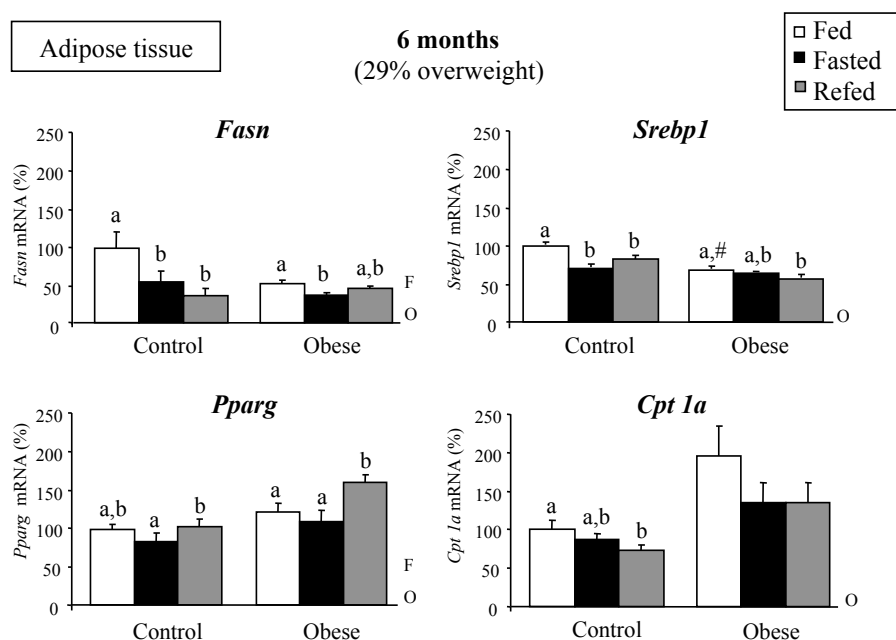


Figure 3. Expression of genes involved in energy homeostasis (*Fasn*, *Srebp1*, *Pparγ* and *Cpt1a*) in retroperitoneal white adipose tissue of 6-month-old control Wistar rats and Wistar rats made obese by cafeteria-diet feeding submitted to *ad libitum* feeding (fed), 14-h fasting (fasted) and 6-h refeeding after fasting (refed), measured by RT-PCR. Results represent mean \pm SEM (n=5) of ratios of specific mRNA levels relative to *Gdi*, expressed as a percentage of the value of fed animals in the control group that was set to 100%. A one-way ANOVA taking into account control and obese animals independently was performed. Within control and obese animals, data not sharing a common letter (a, b, c) are significantly different ($p < 0.05$ and indicated when different). LSD post-hoc test was used after ANOVA analysis. # indicates the effect of obesity induced by cafeteria-diet feeding (obese fed animals vs. their respective controls) (Student's *t* test, $p < 0.05$). Additionally, a two-way ANOVA ($p < 0.05$) was performed considering all the animals and taking into account feeding conditions (F) and obesity (O). For this statistical analysis, F indicates effect of feeding conditions and O effect of obesity induced by cafeteria-diet feeding.

5.- Discussion

There is a large amount of research in recent years focusing on the identification of early makers of obesity development (Brisbois et al., 2012). For studies using rodents as an animal model, the identification of these biomarkers using blood as biological material would simplify a future transference of the obtained knowledge to humans. Here we studied alterations in nutritional response of genes central to energy homeostasis in a subset of blood cells, PBMC, during a process of dietary-induced obesity development in order to evaluate them as an easily accessible source of markers of early homeostatic imbalance which could be used as part of tools to prevent obesity. Our results indicate that PBMC are highly valuable to detect early changes associated with insensitivity to feeding conditions due to the intake of a high fat diet (cafeteria diet).

Physiologically relevant metabolic conditions such as fasting are reflected by PBMC gene expression profiles (Bouwens et al., 2007; Caimari et al., 2010a; Caimari et al., 2010b). We previously observed by microarray analysis that PBMC obtained from 6-month-old rats express genes involved in energy homeostasis and their expression is affected by acute changes in feeding conditions in a similar manner to what is expected in tissues involved in homeostatic control (Caimari et al., 2010a). Using the same animals, here we found that the expression in PBMC of selected genes with a key role in energy metabolism (*Fasn*, *Srebp1*, *Ppar γ* , *Cpt1a* and *Npy*) reflect the expected metabolic adaptations of the organism to acute changes in feeding conditions (feeding, fasting and refeeding) at different time-points during rat development, from 2 to 6 months of age. As a general trend, at the different ages studied (2, 3, 4 and 6 months) the expression of *Fasn*, *Srebp1* and *Ppar γ* in PBMC decreased with fasting and increased with refeeding, in accordance with their role in fatty acid synthesis and adipogenesis. A decrease of *Fasn* and *Srebp1* mRNA levels with fasting was also observed for liver and adipose tissue in 6-month-old animals. *Fasn* codes for fatty acid synthase, the enzyme directly involved in fatty acid synthesis, and *Srebp1* for SREBP1, a critical transcription factor required for the expression of numerous genes involved in fatty acid synthesis, among them fatty acid synthase (Horton et al., 2002). Lipid synthesis in liver and adipose tissue is regulated by food consumption, and a decrease in *Fasn* and *Srebp1* expression with fasting, which is reflected in PBMC, may explain, in part, the decreased lipogenesis in a situation of lack of energetic substrates and of insulin, while refeeding reestablishes lipogenic capacity (Horton et al., 2002). Notably, *Fasn* nutritional regulation was not observed in PBMC of the 6-month-old rats, maybe indicating an insensitivity to feeding conditions related to aging (Caimari et al., 2008; Roth et al., 1981; Yu et al., 1980). Regarding *Ppar γ* , it codes for a transcription factor, PPAR γ , which is highly expressed in adipose tissue and regulates adipogenesis by promoting the expression of specific adipocyte markers (Tontonoz et al., 1995). Moreover, PPAR γ also plays an important role in fatty acid uptake and posterior storage into triacylglycerides (Tontonoz et al., 1995). Thus, in accordance with its role in adipogenesis and lipogenesis, *Ppar γ* expression in adipose tissue is inhibited in fasted animals and is activated with refeeding to allow adipocyte maturation and lipogenesis (Vidal-Puig et al., 1996), and this same pattern was observed in PBMC at the different ages studied. Meanwhile, gene expression in PBMC of *Cpt1a*, with a role in fatty acid beta-oxidation, and of the orexigenic peptide *Npy*, increased with fasting and decreased with refeeding. *Cpt1a* codes for carnitine palmitoyl-transferase 1a, a mitochondrial enzyme (liver form) that is involved in the transport of long-chain fatty acids across the inner membrane by binding them to

carnitine for subsequent beta-oxidation in the mitochondrial matrix. As expected (Zang et al., 2005), our results in liver of 6-month-old animals indicate an increase in *Cpt1a* expression in fasted rats to allow mobilization of fat energy stores, and a decrease with refeeding. The same nutritional profile was evident in PBMC obtained in fasted and refeed conditions during development (2, 3, 4 and 6 months). As we previously demonstrated (Caimari et al., 2010a), PBMC express the gene coding for the orexigenic peptide NPY, a well known potent regulator of food intake, with an important function in energy homeostasis (Dhillon, 2007). *Npy* gene expression was also nutritionally-regulated in PBMC and - in accord with its role stimulating food intake, and similar to what happens in hypothalamus (Mizuno et al., 1999) - an increase with fasting and a decrease with refeeding, which were mainly evident at 6 months of age, was observed. In this way, we provide information indicating that gene expression studied in PBMC provides a representative view of the homeostatic status of the organism at different ages and, as such, represents an interesting tool to obtain biomarkers for nutritional studies and body weight control studies.

Obesity is associated with an insensitivity in the response to feeding conditions (Caimari et al., 2007, 2008; Pico et al., 2002). In our previous study a transcriptomic analysis revealed that nutritional regulation was impaired in PBMC of obese cafeteria rats (29% increased body weight) (Caimari et al., 2010a). Here we analysed the nutritional response of our selected genes in PBMC of rats made obese by the intake of a cafeteria diet at different stages of obesity development. Interestingly, we observed a general lack of response to acute fasting and refeeding in comparison to control-fed animals that was evident after only one month of intake of the high fat diet, when animals had 13% increased body weight (3 months of age), and subsequently, after 2 and 4 months of cafeteria-diet feeding, when animals had 20 and 29% increase in body weight compared to controls, respectively. This general impairment in nutritional response observed in key homeostatic regulatory genes was similar to that observed in liver and adipose tissue (retroperitoneal depot) and would be showing impairment in homeostatic control and, thus, an alteration in the capacity to regulate energy balance which is a characteristic of obese animals. More specifically, during obesity development, PBMC would be reflecting problems in lipid homeostasis (mobilization and storage) by liver and adipose tissue in acute periods of fasting and refeeding and also impairment in hypothalamic regulation of food intake which could be contributing to increased fat deposition.

PBMC are therefore easily obtainable biological material which can be periodically collected that properly reflect the metabolic adaptations to acute changes in fasting and refeeding that take place in liver or adipose tissue. Moreover, the increased adiposity due to the intake of a hyperlipidic diet like the cafeteria diet produces metabolic alterations (such as insulin resistance) which are related to an impairment in the response to feeding (Caimari et al., 2010a; Sampey et al., 2011). These alterations in energy homeostatic control are reflected in PBMC from early stages of weight gain. Studies of changes in gene expression pattern in PBMC can help identify early determinants of the pre-obese state (early markers of obesity) as well as to go further into understanding the molecular mechanisms involved in insensitivity to feeding.

In conclusion, here we show that changes in gene expression in PBMC can be used as early predictors of disease. In particular, alterations in the expression of key energy homeostatic genes in PBMC could indicate metabolic alterations which lead to obesity and, therefore, these cells constitute an easily obtainable source of biomarkers

related to early dysregulation of energy homeostasis, which is potentially useful for interventions aimed at preventing obesity.

Manuscripto 2/Manuscript 2

Reversion to a control balanced diet is able to restore body weight and to recover altered metabolic parameters in adult rats long-term fed on a cafeteria diet

Reynés, B., García-Ruiz, E., Díaz-Rúa, R., Palou, A., Oliver, P.

Food Research International **64**:839-848, 2014

Title page

Title: Reversion to a control balanced diet is able to restore body weight and to recover altered metabolic parameters in adult rats long-term fed on a cafeteria diet

Authors: Bàrbara Reynés, Estefanía García-Ruiz, Rubén Díaz-Rúa, Andreu Palou*, Paula Oliver

Affiliation: Laboratory of Molecular Biology, Nutrition and Biotechnology (LBNB), Universitat de les Illes Balears and CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERObn), Palma de Mallorca, Spain.

Address correspondence to: Prof. Andreu Palou, Laboratory of Molecular Biology, Nutrition and Biotechnology, Universitat de les Illes Balears. Cra. Valldemossa Km 7.5. E-07122-Palma de Mallorca, Spain. Teléfono: +34 971173071. Fax: +34 971173426. E-mail: andreu.palou@uib.es

Running title: Post cafeteria diet reverts obesity-related alterations in adult animal

Author contribution: Paula Oliver and Andreu Palou conceived the experiment. Bàrbara Reynés and Estefanía García-Ruiz did the major part of the experimental work. Rubén Díaz-Rúa was involved in experimental work. Bàrbara Reynés and Paula Oliver wrote the article and Andreu palou participated in critical revising of the manuscript.

Acknowledgements: We thank Enzo Ceresi for technical assistance in the morphological analysis. CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición is an initiative of the ISCIII. This work was supported by the Spanish Government (Ministerio de Educación y Ciencia, EPIMILK -AGL2012-33692-) and by the EU FP7 project BIOCLAIMS -FP7-244995-. Laboratory of Molecular Biology, Nutrition and Biotechnology is a member of the European Research Network of Excellence NuGO (The European Nutrigenomics Organization, EU Contract: FOOD-CT-2004-506360 NUGO). Authors belong to the Nutrigenomics-group, awarded as “Group of Excellence” of CAIB and supported by “Direcció General d’Universitats, Recerca i Transferència del Coneixement” of Regional Government (CAIB) and FEDER funds (EU). EGR and RDR are recipients of a fellowship from the University of the Balearic Islands and from the Spanish Government, respectively.

Conflict of interest: None

1.- Abstract

The increased intake of fat-rich foods is one of the causes of the increasing incidence of obesity. However, there are controversial data on the reversibility of diet-induced obesity and its metabolic complications when adopting a control energy-balanced diet. Our aim was to evaluate the ability to reset not only body weight but metabolic disorders caused by a highly palatable high fat diet, cafeteria diet, administered to adult rats, when replaced by a control diet (post-cafeteria model). Four-months of cafeteria diet-feeding produced important metabolic alterations in comparison to a commercial purified high fat diet: a rapid, drastic increase in body weight, adiposity and related complications such as insulin resistance, decreased glucose tolerance and development of hepatic steatosis. At gene level, decreased lipogenic and increased lipolytic gene expression in key energy homeostatic tissues as a physiological adaptation to increased fat intake was observed. In addition, fasting response of serum parameters and of key genes in lipid metabolism was impaired in cafeteria-fed animals. Contrary to what we have previously described if cafeteria diet is administered early in life, when administered to adult animals, its replacement with a balanced diet is able to restore body weight. Cafeteria diet withdrawal also allows recovery from metabolic damage, gene expression regulation and fasting response, the degree of which is dependent on the time of exposure to the cafeteria diet. Adherence to an *ad libitum* intake of a balanced standard diet can enable the recovery of healthy status in animals which were previously exposed to an unhealthy cafeteria diet in adult age.

2.- Introduction

The prevalence of obesity caused by environmental factors has increased exponentially in developed countries due to consumption of energy rich foods, often with a high fat content, and by a reduction in physical activity (Schrauwen and Westerterp, 2000; Wright and Aronne, 2012). Rodent animal models have been traditionally used to study obesity induced by the intake of high fat diets (Buettner et al., 2007) which allows obtaining metabolic information not attainable with non-invasive sampling. These diets result in increased body weight and adiposity and, as happens in humans, in other alterations related to metabolic syndrome such as insulin resistance, hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia (Sampey et al., 2011). In addition, high fat content diets induce metabolic changes in different tissues involved in energy homeostasis control as a physiological adaptation to the increased amount of fat (Estadella et al., 2004). Among the different experimental diets used to induce obesity, the so-called cafeteria diet is a highly palatable hyperlipidic diet that induces persistent voluntary hyperphagia and a rapid, high and persistent weight gain (Caimari et al., 2010c; Sampey et al., 2011). In contrast, commercial high fat diets produce an initial high energy intake, associated to early weight gain, but this overfeeding declines after some weeks, and body weight is then stabilized (Sampey et al., 2011; Vial et al., 2011). Remarkably, although both diets are associated with the development of obesity and related alterations, they trigger different degrees of overweight/obesity (Caimari et al., 2010c; Priego et al., 2009; Sampey et al., 2011). To our knowledge there is only one recent study comparing directly the two hyperlipidic diets (Sampey et al., 2011). A question remains as to whether it is possible to reverse increased body weight and adiposity and the important metabolic alterations caused by the prolonged intake of a cafeteria diet. Our previous studies indicate that prolonged (3 months) cafeteria diet feeding initiated during early life (from the age of 10 days) produces an important and persistent increase in body weight and permanent metabolic alterations which are not completely reverted when this diet is replaced by a control normolipidic diet (post-cafeteria model) (Lladó et al., 1991; Matamala et al., 1996; Proenza et al., 1992; Rodríguez et al., 2003). However, the consequences of reversion to a control diet in animals with prolonged cafeteria diet feeding during adulthood have not been addressed in detail. Different studies have analysed the effects of the of cafeteria diet withdrawal in rodents, but the results are controversial; some indicate persistence of obesity (Rolls et al., 1980; South et al., 2012) while others report more or less reversal of obesity (Levin and Dunn-Meynell, 2002; Ong et al., 2013). However, most of the studies cover only a few general metabolic or anthropometric parameters or are focused in behavioral aspects, therefore a detailed analysis to determine the success of cafeteria diet removal not only on recovery of body weight but also on recovery of alterations related to metabolic syndrome, energy homeostasis maintenance or altered gene expression have not been performed.

Thus, the aim of this study was to evaluate whether a reversion to a standard balanced diet is enough to recover body weight and the altered metabolic parameters in adult animals fed on a cafeteria diet for different time periods. Since impaired fasting response is an indicator of metabolic alterations related to obesity (Caimari et al., 2007), we have studied recovery of fasting sensitivity to evaluate metabolic recovery associated to weight loss. Secondarily, we have compared the impact of a long-term cafeteria and a commercial high fat diet feeding on body weight and energy homeostatic metabolism.

3.- Methods

3.1.- Animals, diets and experimental design

All animal experimental procedures were reviewed and approved by the Bioethical Committee of our university, and guidelines for the use and care of laboratory animals of the university were followed.

Two different experimental designs were performed. In Experiment 1, two-month-old male Wistar rats (Charles River Laboratories España, SA, Barcelona, Spain) were divided into groups fed for 4 months with different diets: a control group (Control; n = 12), with animals fed a standard normal fat diet –control diet– (with 10% calories from fat) (Ref. D12450B, Research Diets, Brogaarden, Denmark); a cafeteria group (CAF1; n = 12), with animals fed a cafeteria diet in addition to the control diet; a post-cafeteria group (PCAF1; n = 12), with animals fed initially for two months with cafeteria diet plus control diet, and for two more months with a control diet; and a high fat group (HF; n = 7), with animals fed a commercial high fat diet (with 60% calories from fat) (Ref. D12492, Research Diets, Brogaarden, Denmark). In Experiment 2, two-month-old male Wistar rats were divided into groups fed for 3 months with different diets: a control group (Control; n = 12), with animals fed a control normal fat diet; a cafeteria group (CAF2; n = 12), with animals fed a cafeteria diet in addition to the control diet; and a post-cafeteria group (PCAF2; n = 12), with animals fed for one and a half months with a cafeteria diet in addition to the control diet, and then for one and a half months with the control diet.

The cafeteria diet contained the following foodstuffs: cookies with liver pate and sobrassada (a typical Majorcan sausage), candies, fresh bacon, biscuits, chocolate, salted peanuts, cheese, milk containing 20% (w/v) sucrose and ensaïmada (a typical Majorcan pastry) (Caimari et al., 2010c; Oliver et al., 2013). The gross composition of the diets was as follows: for the control normal fat diet, 70% calories from carbohydrate, 10% from fat and 20% from protein; for the cafeteria diet, 27% calories from carbohydrate, 62% from fat and 11% from protein (this composition was calculated based on the foodstuffs ingested by the animals (Ribot et al., 2008)); and for the commercial high fat diet, 20% calories from carbohydrate, 60% from fat and 20% from protein. Fatty acid profile (saturated/unsaturated) was similar for the two-hyperlipidic diets used.

The animals were housed in pairs at 22°C with a period of light/dark of 12 h. Food and water were offered *ad libitum* and body weight was followed twice a week. Food intake was recorded in the control and HF groups (in Experiment 1) and in PCAF groups (in Experiments 1 and 2); an exhaustive recording of the intake of the cafeteria diet used in this experiment had already been performed by our group (Ribot et al., 2008). Body fat composition was determined every two weeks using an EchoMRI-700TM (Echo Medical Systems, LLC, TX, USA). At the end of the experimental period, when animals were 6 or 5 months old (for Experiments 1 and 2 respectively), each group of rats was divided into two subgroups and submitted to different feeding conditions (n = 6 for each condition): feeding (animals provided with *ad libitum* access to diet) and fasting (animals with a nocturnal fasting of 14 h). Cages were changed immediately prior to food deprivation in order to prevent coprophagy.

After the experimental feeding period, fed and fasted animals were weighed and their nasal-anal length was measured to obtain the body mass index and the Lee index. Afterwards, the animals were sacrificed by decapitation and the different white adipose tissue depots, both visceral (epididymal, mesenteric and retroperitoneal) and

subcutaneous (inguinal), interscapular brown adipose tissue, liver and gastrocnemius muscle were rapidly removed, weighed, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until RNA analysis. Truncular blood was collected from the neck, stored at room temperature for 1 h, and was then centrifuged at 1000 g for 10 min at 4°C to collect the serum.

3.2- Adiposity index

Adiposity was determined as an adiposity index computed for each rat: the sum of epididymal, inguinal, mesenteric and retroperitoneal white adipose tissue depots was weighed and expressed as a percentage of total body weight.

In addition, two other indicators of adiposity were calculated: the body mass index (BMI) and the Lee index (Novelli et al., 2007; Scoaris et al., 2010).

3.3.- Measurement of circulating parameters (glucose, insulin, leptin and triacylglycerols)

Blood glucose concentration was measured using an Accu-Chek Glucometer (Roche Diagnostics, Barcelona, Spain). Serum insulin and leptin levels were determined using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (from Mercodia AB, Uppsala, Sweden and R&D Systems, Minneapolis, MN, USA, respectively). Serum ghrelin concentration was measured using an enzyme immunoassay kit (Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Burlingame, CA, USA). Circulating triacylglycerols were measured using a commercial enzymatic colorimetric kit (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO, USA).

3.4.- HOMA-IR analysis

Insulin resistance was assessed by the homeostatic model assessment for insulin resistance (HOMA-IR). It was calculated from fasting insulin and glucose concentrations using the formula of Matthews et al. (Matthews et al., 1985).

3.5.- Oral glucose tolerance test

Glucose responses to an oral glucose tolerance test (OGTT) were also measured to assess insulin sensitivity. The test was performed in animals of Experiment 1, at the end of the experimental period (6-month-old animals), as previously described by Sánchez et al. (Sánchez et al., 2008). The total OGTT area under the curve (AUC) was calculated using the trapezoid method.

3.6.- Quantification of lipid levels

Total lipid levels were determined in liver using the Folch method (Folch et al., 1957).

3.7.- Histological analysis

Liver samples were fixed by immersion in 4% paraformaldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.4, overnight at 4 °C, dehydrated in a graded series of ethanol, cleared, and embedded in paraffin blocks for light microscopy. Five-micrometer-thick sections of tissues were cut with a microtome and mounted on slides. Presence of steatosis was visually analysed in stained liver sections. The degree of steatosis was calculated according to Brunt et al. classification (Brunt et al., 1999).

3.8.- Total RNA isolation

Total RNA from liver and gastrocnemius muscle was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. Total RNA from white and brown adipose tissue was extracted using TriPure reagent (Roche Diagnostics Barcelona, Spain) and was then purified using E.Z.N.A. Total RNA Kit I (Omega Bio-Tek, Vermont, USA). Isolated RNA from all tissues was purified by precipitation with 3 M sodium acetate and absolute ethanol. RNA was quantified using the NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NadroDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA) and its integrity was confirmed using agarose gel electrophoresis.

3.9.- Real-time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis

Real-time RT-PCR was carried out to determine mRNA expression levels of key genes involved in energy homeostasis maintenance. In the white – inguinal and retroperitoneal – and brown adipose tissue depots, liver and muscle, selected genes were analysed.

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Amplicon size (bp)
<i>Atgl</i>	TGTGGCCTCATTCTCCTAC	AGCCCTGTTTGACATCTCT	230
<i>Cpt1a</i>	GCTCGCACATTACAAGGACAT	TGGACACCACATAGAGGCAG	250
<i>Cpt1b</i>	GCAAACCTGGACCGAGAAGAG	CCTTGAAGAAGCGACCTTTG	180
<i>Fasn</i>	CGGCGAGTCTATGCCACTAT	ACACAGGGACCGAGTAATGC	222
<i>Fgf21</i>	AGGCTTTGACACCCAGGATT	ACAGATGACGACCAGGACAC	145
<i>Srebp1a</i>	CCCACCCCCTTACACACC	GCCTGCGGTCTTCATTGT	198
<i>Gdi1</i>	CCGCACAAGGCAAATACATC	GACTCTCTGAACCGTCATCAA	159
<i>(reference gene)</i>			

Supplementary Table. Nucleotide sequences of primers used for RT-PCR amplification and size of the PCR products. *Atgl*: adipose triglyceride lipase; *Cpt1a*: carnitine palmitoyltransferase 1 α ; *Cpt1b*: carnitine palmitoyltransferase 1 β ; *Fasn*: fatty acid synthase; *Fgf21*: fibroblast growth factor 21; *Gdi1*: guanosine diphosphate dissociation inhibitor 1; *Srebp1a*: sterol regulatory element-binding protein 1.

In brief, 0.25 μ g of total RNA was reverse transcribed to cDNA, which was amplified by RT-PCR according to Applied Biosystems' instructions (Oliver et al., 2013). The threshold cycle (Ct) was calculated by the instrument's software (StepOne Software v2.0, from Applied Biosystems) and the relative expression of each mRNA was calculated as a percentage of control rats, using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak and Schmittgen, 2001). Data were normalized against the reference gene guanosine diphosphate dissociation inhibitor 1 (*Gdi1*), based on microarray analysis (Caimari et al., 2010a). Primers for the different genes are described in Supplementary Table. All primers were obtained from Sigma Genosys (Sigma Aldrich Química SA, Madrid, Spain).

3.10.- Statistical analysis

All data are expressed as the mean \pm SEM. Differences between the experimental groups fed with different diets were analysed using ANOVA with a LSD post-hoc test. Due to the fact that the number of experimental groups was different in the two experiments performed, to make a comparison between both experiments possible, statistical significance of the different experimental groups vs. control was also analysed using Student's *t* test. Effect of fasting was analysed using Student's *t*-test. The test used for each comparison is specified in the footnotes of the tables and figures. The analyses were performed with SPSS for windows (SPSS, Chicago, IL, USA). Threshold of significance was defined at $p < 0.05$, and is indicated when different.

4.- Results

4.1.- Body weight, adiposity and circulating parameters

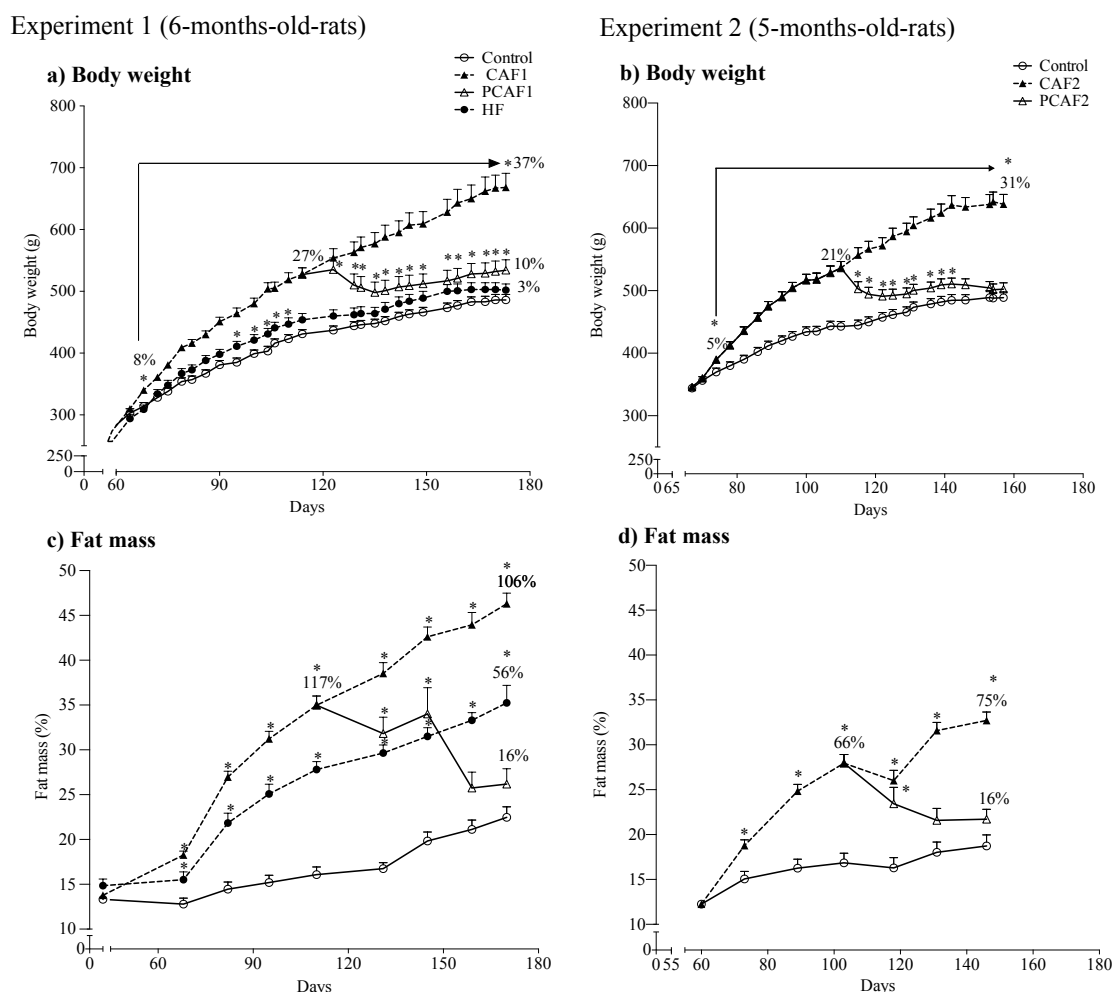


Figure 1. Body weight (a) and body fat mass (b) in 6-month-old rats fed for 4 months with a control, a commercial high fat (HF) or a cafeteria diet (CAF1), or with a control diet for 2 months after 2 months of cafeteria feeding (PCAF1) – Experiment 1 –; and (c and d) in 5-month-old rats fed for 3 months with a control or a cafeteria diet (CAF2), or with a control diet for 1.5 months after 1.5 months of cafeteria feeding (PCAF2) – Experiment 2. Data represent means \pm SEM (n=12 for the control, CAF and PCAF groups and n= 7 for the HF group). * vs. control group (Student's *t* test, $p < 0.05$).

4.1.1.- Cafeteria feeding

The intake of a cafeteria diet resulted in an important increase in body weight and adiposity. Animals from the two experimental procedures: fed a cafeteria diet for 4 (CAF1) or 3 months (CAF2) attained 37% and 31% increased body weight, respectively (Figure 1 a and c), 106% (CAF1) and 75% (CAF2) increased fat mass (Figure 1 b and d) and 106% (CAF1) and 64% (CAF2) increased adiposity index (Table 1). Regardless of time of administration, cafeteria diet induced an increase in all the white adipose depots analysed (visceral and subcutaneous) and also in the size of brown adipose tissue (Table 1). As expected, the increase in body fat was related to a rise in circulating leptin in both cafeteria experiments (Table 2). CAF1, but not CAF2 animals presented lower circulating triacylglycerols (Table 2). All cafeteria animals presented a greater liver size and increased total lipid content in liver (683%

increase for CAF1, and 297% for CAF2) (Table 1). According to the increased lipid content, the histological analyses (performed in the CAF1 group) revealed the presence of hepatic microvesicular steatosis (third degree) in animals fed a cafeteria diet (Supplementary Figure). Cafeteria diet also resulted in higher glucose levels in the fed state and fasting insulin levels (Table 2). HOMA-IR and also the area under the curve (AUC) obtained in the OGTT measured in Experiment 1 were increased indicating insulin resistance and impaired glucose clearance (Table 2a). Control animals of both cafeteria experiments presented lower circulating leptin, glucose, insulin and triglyceride levels in fasted vs. fed conditions. In the CAF1 group, fasting response disappeared for all the circulating parameters analysed, indicating impairment in the sensitivity to feeding conditions related to obesity (Table 2a). In the CAF2 group, insensitivity to fasting was also observed for circulating leptin and insulin, but not for glucose or triacylglycerols (Table 2b).

4.1.2.- Commercial high fat feeding

Administration of a commercial high fat (HF) diet produced an increased caloric intake during the first month (89.2 ± 2.3 kcal per day in the HF vs. 74.3 ± 2.7 kcal/day in the control group, Student's *t* test, $p < 0.05$), but this hyperphagia disappeared the second and third months of diet administration and a decreased caloric intake was even observed during the last month of dietary treatment (60.3 ± 0.9 kcal/day in the HF vs. 79.3 ± 4.3 kcal/day in the control group, Student's *t* test, $p < 0.05$). According to these data, we observed an initial increased body weight which was significant after the first month of diet, but was normalized thereafter. Thus, and contrary to the cafeteria diet, the intake of a commercial HF diet for 4 months (HF group) resulted in no change in body weight in comparison to the control-fed animals at the end of the experimental period (Figure 1a). However, in spite of this, the HF diet produced increased adiposity and alterations in related metabolic parameters, although not so marked as in cafeteria-fed rats. Animals of the HF group displayed 56% greater fat mass and 70% higher adiposity index than control animals but, contrary to what happened in CAF1 animals, neither BMI nor Lee index was affected (Figure 1b and Table 1a) and circulating leptin levels were not significantly increased (Table 2a). HF diet induced an increase in all the white adipose depots, although the weight of these depots was greater in the cafeteria-fed animals; however, contrary to what was observed with the cafeteria diet, the size of brown adipose tissue was not increased (Table 1a). Total lipid content in liver was increased (185% increase in HF vs. control animals, Student's *t* test, $p < 0.05$), although to a much lower extent in comparison to the CAF1 group (Table 1a). Histological analysis did not show apparent signs of liver hepatic steatosis in animals fed a HF diet (Supplementary Figure). Circulating glucose levels, HOMA-IR and AUC obtained in the OGTT were not significantly affected by HF feeding (Table 2a).

Adipose parameters and tissue size

a) Experiment 1 (6-month-old rats)

	Control	HF	CAF1	PCAF1
Adiposity index (%)	8.96 ± 0.95 ^a	15.2 ± 0.5 ^{bΔ}	18.5 ± 2.0 ^{cΔ}	11.8 ± 1.0 ^d
BMI (g/cm ²)	0.82 ± 0.04 ^a	0.79 ± 0.02 ^{aΔ}	1.05 ± 0.04 ^{bΔ}	0.83 ± 0.04 ^a
Lee index	0.32 ± 0.01 ^a	0.32 ± 0.00 ^a	0.34 ± 0.01 ^{bΔ}	0.32 ± 0.01 ^a
Liver lipid content (mg/g tissue)	12.9 ± 3.7 ^a	36.8 ± 4.5 ^{aΔ}	101 ± 24 ^{bΔ}	24.3 ± 8.2 ^a
Liver (g)	15.2 ± 0.6 ^a	12.6 ± 0.3 ^{bΔ}	20.9 ± 1.5 ^{cΔ}	15.6 ± 0.9 ^a
BAT (g)	0.45 ± 0.05 ^a	0.57 ± 0.03 ^{a,c}	0.88 ± 0.05 ^{bΔ}	0.70 ± 0.11 ^{b,c}
iWAT (g)	10.0 ± 1.5 ^a	16.8 ± 0.7 ^{bΔ}	34.3 ± 1.1 ^{cΔ}	13.6 ± 2.5 ^{a,b}
rWAT (g)	14.2 ± 2.0 ^a	27.9 ± 1.8 ^{bΔ}	42.7 ± 1.2 ^{cΔ}	23.4 ± 3.5 ^{a,b Δ}
mWAT (g)	7.13 ± 1.21 ^a	12.8 ± 1.1 ^{bΔ}	30.7 ± 3.7 ^{cΔ}	9.43 ± 1.00 ^{a,b}
eWAT (g)	15.1 ± 1.9 ^a	22.8 ± 1.9 ^{bΔ}	39.4 ± 2.4 ^{cΔ}	19.1 ± 1.6 ^{a,b}

b) Experiment 2 (5-month-old rats)

	Control	CAF2	PCAF2
Adiposity index (%)	10.8 ± 0.5 ^a	17.7 ± 0.5 ^{bΔ}	10.9 ± 1.1 ^a
Liver lipid content (mg/g tissue)	29.0 ± 3.4 ^a	115 ± 7 ^{bΔ}	32.1 ± 1.9 ^a
Liver (g)	14.9 ± 0.3 ^a	19.8 ± 0.8 ^{bΔ}	14.9 ± 0.9 ^a
BAT (g)	0.75 ± 0.02 ^a	1.46 ± 0.10 ^{bΔ}	0.75 ± 0.05 ^a
iWAT (g)	14.8 ± 0.9 ^a	29.9 ± 2.6 ^{bΔ}	13.9 ± 1.3 ^a
rWAT (g)	15.3 ± 0.8 ^a	32.5 ± 2.2 ^{bΔ}	16.6 ± 2.4 ^a
mWAT (g)	8.43 ± 0.29 ^a	24.3 ± 2.1 ^{bΔ}	10.1 ± 2.1 ^a
eWAT (g)	15.0 ± 0.9 ^a	27.8 ± 2.2 ^{bΔ}	15.1 ± 1.7 ^a

Table 1. Adiposity index, body mass index (BMI), Lee index, lipid content in liver and tissue size measured in: a) 6-month-old rats fed for 4 months with a control, a commercial high fat (HF) or a cafeteria diet (CAF1), or with a control diet for 2 months after 2 months of cafeteria feeding (PCAF1) – Experiment 1 – and b) 5-month-old rats fed for 3 months with a control or a cafeteria diet (CAF2), or with a control diet for 1.5 months after 1.5 months of cafeteria feeding (PCAF2) – Experiment 2. BAT: interscapular brown adipose tissue; iWAT: inguinal WAT; rWAT: retroperitoneal WAT; mWAT: mesenteric WAT and eWAT: epididymal WAT. Results represent means ± SEM (n=6 to 7). Bars not sharing a common letter (a, b and c) are significantly different (one-way ANOVA, p<0.05 and LSD post-hoc test). Δ vs. control animals (Student's *t* test, p<0.05).

4.1.3.- Reversion of cafeteria to control diet feeding

Reversion to a control diet after 2 or 1.5 months of cafeteria diet feeding (PCAF1 and PCAF2 groups) had a different impact on body weight and metabolic recovery. 2 months of cafeteria feeding produced 27% increased body weight and 117% increased fat mass content. After 2 months of reversion to a control diet (PCAF1 group) excessive body weight was not completely reverted (10% over the control group) (Figure 1a). However, indicators of adiposity such as fat mass content, adiposity index, BMI and Lee index were recovered (Student's *t* test, $p < 0.05$) (Figure 1b and Table 1a). A lower time of exposure to the cafeteria diet, 1.5 months, produced 21% increased body weight and 66% greater fat mass. In this case, 1.5 months of reversion to a control diet (PCAF2 group) was enough time to recover body weight, and also fat mass content and adiposity index (Figure 1c and d and Table 1b). After withdrawal of the cafeteria diet, PCAF animals presented lower food intake during the first 18 days for PCAF1 (accumulated food intake: 804 ± 3331 kcal in the PCAF1 vs. 1233 ± 33 kcal in the control group, Student's *t* test, $p < 0.05$) and 19 days for PCAF2 (accumulated food intake: 831 ± 35 kcal in the PCAF2 vs. 1303 ± 22 kcal in the control group, Student's *t* test, $p < 0.05$), but food intake was normalized to that of control animals thereafter. As shown in Table 1, PCAF1 animals did not present increased lipid content in liver and histological analyses revealed no sign of hepatic steatosis (Supplementary Figure); lipid liver content in PCAF2 was also similar to that of controls in PCAF2 animals. Both PCAF1 and PCAF2 animals were normoleptinemic and normoglycemic in the fed state, and displayed fasting insulin levels similar to those of control animals (Table 2). HOMA-IR was recovered in PCAF2 but not in PCAF1 animals, although glucose response, measured as AUC in the PCAF1 group was not different to that of control animals (Table 2a). Impaired fasting response observed for circulating parameters in cafeteria-fed animals was improved in post-cafeteria animals. In animals of the PCAF1 group, as happened in CAF1 animals, no fasting response was observed for circulating glucose and leptin, while a recovery of fasting response was observed for circulating insulin and triacylglycerols (Table 2a). PCAF2 animals showed insulin and triacylglycerol fasting response, while leptin response to fasting was not completely recovered (Table 2b).

Circulating parameters and indicators of insulin action

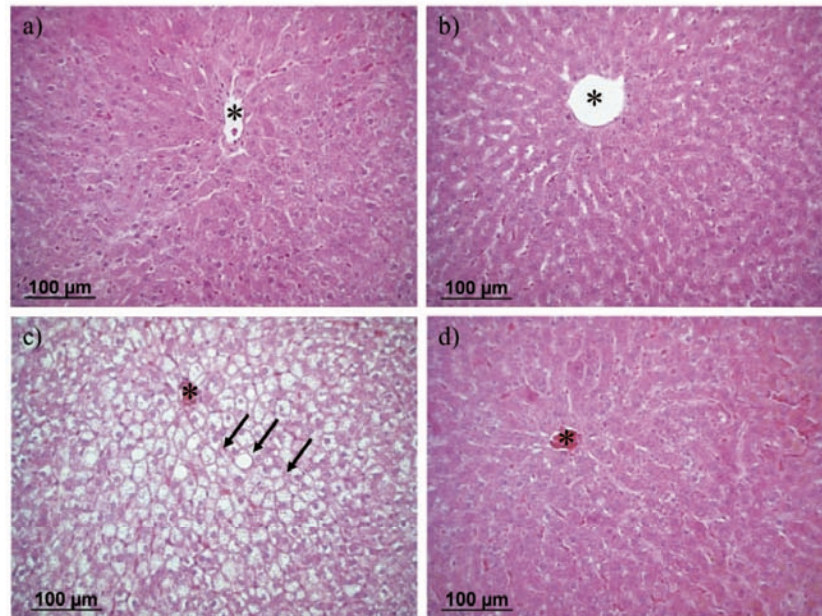
a) Experiment 1 (6-month-old rats)

	Control		HF		CAF1		PCAF1	
	Feeding	Fasting	Feeding	Fasting	Feeding	Fasting	Feeding	Fasting
Glucose (mg/dl)	108 ± 3	97.6 ± 2.3*	114 ± 4	120 ± 2 ^Δ	110 ± 3 [#]	113 ± 6	115 ± 7	
Insulin (µg/l)	2.44 ± 0.44	0.62 ± 0.09*	1.86 ± 0.21	2.83 ± 0.36	1.83 ± 0.5 [#]	2.29 ± 0.33	0.86 ± 0.24*	
Leptin (µg/l)	14.4 ± 2.6 ^a	8.50 ± 0.72	19.7 ± 1.4 ^a	43.2±2.5 ^{bΔ}	35.6±4.5 [#]	12.3 ± 2.1 ^a	9.55 ± 2.30	
Triacylglycerols (mg/ml)	2.05 ± 0.15 ^a	1.45 ± 0.18*	1.56±0.19 ^b	1.06±0.11 ^{cΔ}	1.09±0.10	3.07 ± 0.21 ^d	1.74 ± 0.36*	
HOMA-IR	3.90 ± 0.76		4.60±1.02	7.42±1.48 ^Δ		6.98 ± 1.07 ^Δ		
AUC (mg min/dl)	19846 ± 659 ^a		19316 ± 444 ^a	23509 ± 1032 ^{bΔ}		20454 ± 728 ^a		

b) Experiment 2 (5-month-old rats)

	Control		CAF2		PCAF2	
	Feeding	Fasting	Feeding	Fasting	Feeding	Fasting
Glucose (mg/dl)	114 ± 5 ^a	97.7 ± 3.3*	137 ± 3 ^{bΔ}	107 ± 3*	116 ± 3 ^a	110 ± 5
Insulin (µg/l)	1.86 ± 0.16	0.60 ± 0.05*	2.38 ± 0.45	1.48 ± 0.13 [#]	1.82 ± 0.33	0.61 ± 0.08*
Leptin (µg/l)	12.1 ± 1.1 ^a	3.83 ± 0.62*	26.1 ± 1.2 ^{bΔ}	20.3 ± 2.5 [#]	10.5 ± 1.8 ^a	6.25 ± 1.24
Triacylglycerols (mg/ml)	3.86 ± 0.53	1.68 ± 0.28*	2.73 ± 0.55	1.31 ± 0.16*	3.73 ± 0.43	2.70 ± 0.23 ^{**#}
HOMA-IR	5.16 ± 0.90 ^a		8.21 ± 1.01 ^{bΔ} (Δ, p=0.06)		6.04 ± 1.20 ^{a,b}	

Table 2. Serum glucose, insulin, leptin and triacylglycerol levels, HOMA-IR and area under the curve (AUC) obtained after the oral glucose tolerance test, measured in the same animals described in Table 2, both in feeding and fasting (14h) conditions. Data represent means ± SEM (n=6 to 7). Bars not sharing a common letter (a, b and c) are significantly different (one-way ANOVA, p<0.05 and LSD post-hoc test, p<0.05 or indicated when different). Δ vs. control animals; * fasted vs. control fed animals and # vs. control fasted animals (Student's t test, p<0.05, or indicated when different).



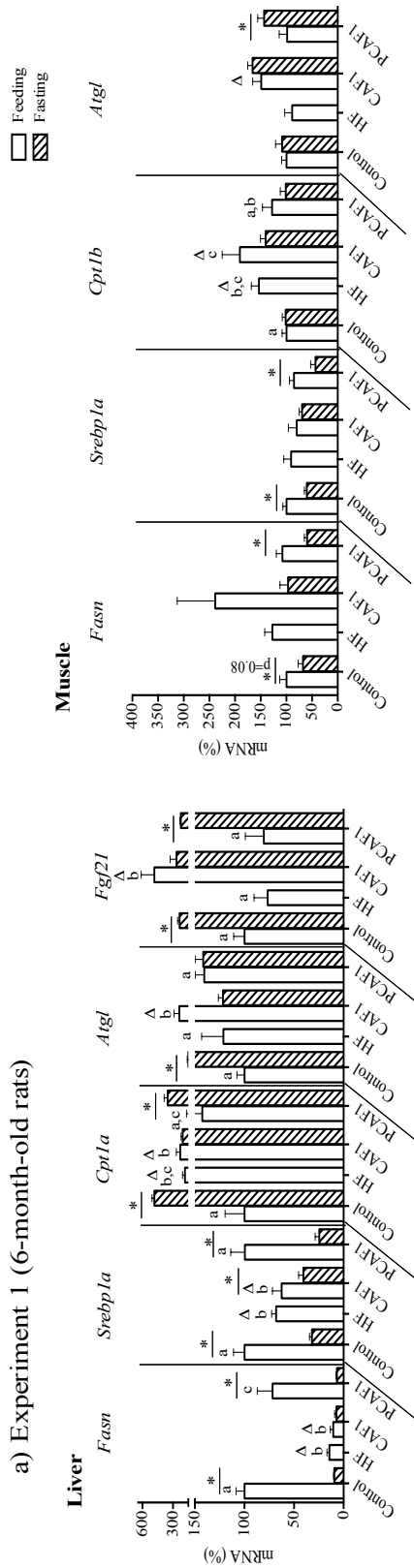
Supplementary Figure. Liver sections stained with hematoxylin and eosin. Representative sections of liver stained with hematoxylin and eosin, in Experiment 1 animals: a) control, b) high fat, c) cafeteria and d) post-cafeteria groups. See Figure 1 for details on animal groups. An asterisk indicates liver central vein and arrows indicate some hepatocytes with evident steatosis. Vacuoles representing lipid droplets inside the hepatocytes with focal distribution are present in cafeteria group compared to other groups. Bar=100 µm.

4.2.- Regulation of mRNA expression of key energy homeostatic genes by the intake of different high fat diets and by fasting conditions

4.2.1.- Liver

As shown in Figure 2, feeding with a cafeteria (CAF1 and CAF2 groups) or commercial high fat (HF) diet decreased liver expression of genes involved in fatty acid synthesis, *Fasn* and *Srebp1a*, but increased the expression of the key lipolytic gene *Cpt1a*. Furthermore, the administration of a cafeteria diet was related to an increase in mRNA of two other lipolytic genes, *Atgl* and *Fgf21*; this increase was not observed in response to the commercial HF diet. The most drastic change was observed for *Fasn* mRNA expression, which diminished around 90% independently of the high fat diet. Reversion to a control diet was related to a recovery in basal expression levels of all the studied genes. Surprisingly, we observed a decrease in *Fgf21* mRNA expression the PCAF2 group.

a) Experiment 1 (6-month-old rats)



b) Experiment 2 (5-month-old rats)

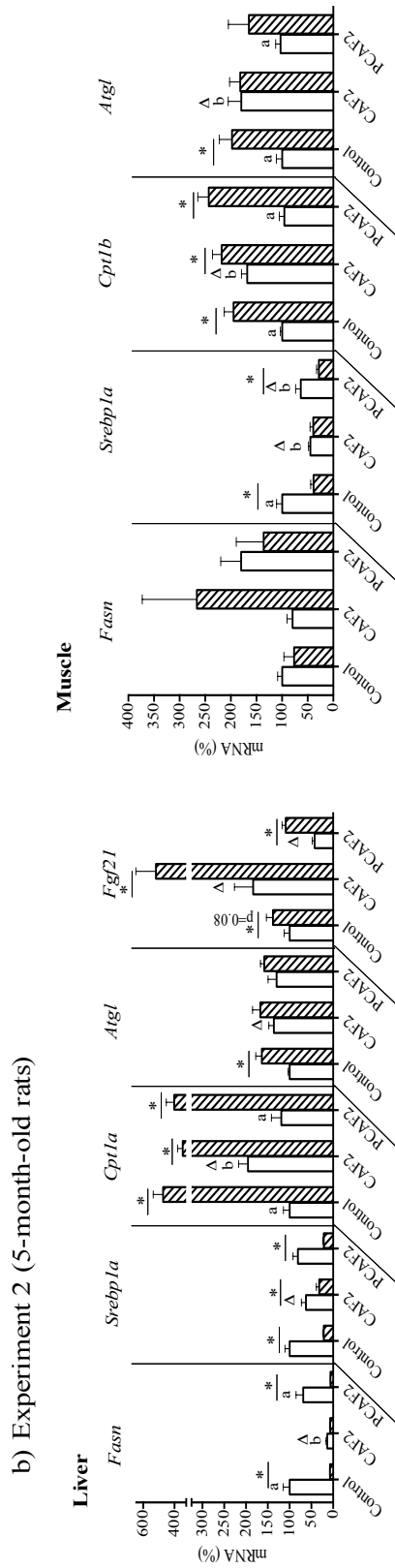


Figure 2. mRNA expression of genes involved in energy homeostasis (*Fasn*, *Srebp1a*, *Cpt1a* –measured in liver–, *Cpt1b* –measured in muscle–, *Atgl* and *Fgf21*) in liver and muscle measured in the experimental groups described in Figure 1, both in feeding and fasting (14h) conditions. mRNA expression was measured by Q-PCR. Data represent means \pm SEM (n=6 to 7) of ratios of specific mRNA levels relative to *Gdi* (used as reference gene), expressed as a percentage of the value of fed animals in the control group that was set to 100%. Bars not sharing a common letter (a, b and c) are significantly different (one-way ANOVA, $p < 0.05$) and LSD post-hoc test ($p < 0.05$ or indicated when different). Δ vs. control animals; * fasted vs. control fed animals (Student's *t* test, $p < 0.05$ or indicated when different).

As expected, in control animals, 14 h-fasting produced a decrease in expression of lipogenic (*Fasn* and *Srebp1a*) and an increase in expression of lipolytic (*Cpt1a*, *Atgl* and *Fgf21*) genes (Figure 2). As a general trend, the fasting response was impaired in cafeteria fed animals. This insensitivity to feeding seems more evident in CAF1 than in CAF2 animals and, thus, would be dependent on time of administration of the diet. In CAF2 animals, in spite of the degree of obesity, there was an increase in *Cpt1a* mRNA expression with fasting. In most of the cases, the PCAF 1 and PCAF 2 groups showed a recovery of sensitivity to fasting conditions, presenting the same response to food deprivation as control group.

4.2.2.- Muscle

As shown in Figure 2, cafeteria diet feeding (CAF1 and CAF2 groups) produced an increased expression in muscle of the lipolytic genes *Cpt1b* and *Atgl*; the increase in *Cpt1b* was also observed for the HF diet. Altered expression was recovered in post-cafeteria animals. In CAF2 animals a decrease was evident for the lipogenic *Srebp1a* mRNA levels which was not observed in CAF1 or HF animals, and which was not recovered in the PCAF2 group. In control animals, fasting produced a decrease in the lipogenic *Fasn* (in Experiment 1) and *Srebp1a* genes and an increase in the lipolytic *Atgl* and *Cpt1b* gene expression (observed in Experiment 2). Fasting response was lost in cafeteria-fed animals for *Fasn* (in CAF1 group) and for *Srebp1a* and *Atgl* (in CAF2 group). Fasting sensitivity was recovered for *Fasn*, *Srebp1a* and *Atgl* in the post-cafeteria animals.

4.2.3.- Brown adipose tissue

As shown in Figure 3, in BAT, administration of high fat diets in both experiments resulted in a decrease in mRNA levels of the lipogenic gene *Fasn* and an increase for the lipolytic *Cpt1b*; no change was observed in *Srebp1a* or *Atgl* mRNA expression for either of the studied diets. Again here, the reversion of cafeteria to a control diet shifted the mRNA levels of both genes back to the basal levels. As occurred in the liver, 14-h fasting decreased the expression of the lipogenic genes *Fasn* and *Srebp1a*, and increased the expression of the lipolytic genes *Cpt1b* and *Atgl*. As expected, fasting response was not observed in cafeteria-obese animals and was recovered for all the genes, except for *Atgl*, in post-cafeteria animals

4.2.4.- White adipose tissue

Figure 4 represents gene expression in two white adipose depots, the inguinal and the retroperitoneal, selected as representatives of subcutaneous and visceral white fat, respectively. Gene expression regulatory pattern was similar for both adipose depots, and similar to that observed in the other tissues analysed. In Experiment 1, both high fat diets (cafeteria and commercial high fat) induced a decreased *Fasn* and *Srebp1a* expression in the two adipose depots. *Cpt1b* expression increased in response to both high fat diets in the retroperitoneal depot, but in the inguinal depot only the cafeteria diet and not the commercial HF diet induced a drastic increase (141%) in the expression of the lipolytic gene. *Atgl* gene expression increased in response to both high fat diets but only in the inguinal adipose depot. In the PCAF1 group, the basal expression levels found in control animals were recovered. Fasting induced changes in gene expression levels of the studied genes, which were more evident in the

retroperitoneal than in the inguinal adipose depot; this response was impaired in cafeteria-fed animals and recovered in the post-cafeteria animals. The Experiment 2 showed the same regulatory pattern as Experiment 1, especially in the retroperitoneal depot, as no statistical significances were obtained in the inguinal adipose depot due to greater variability.

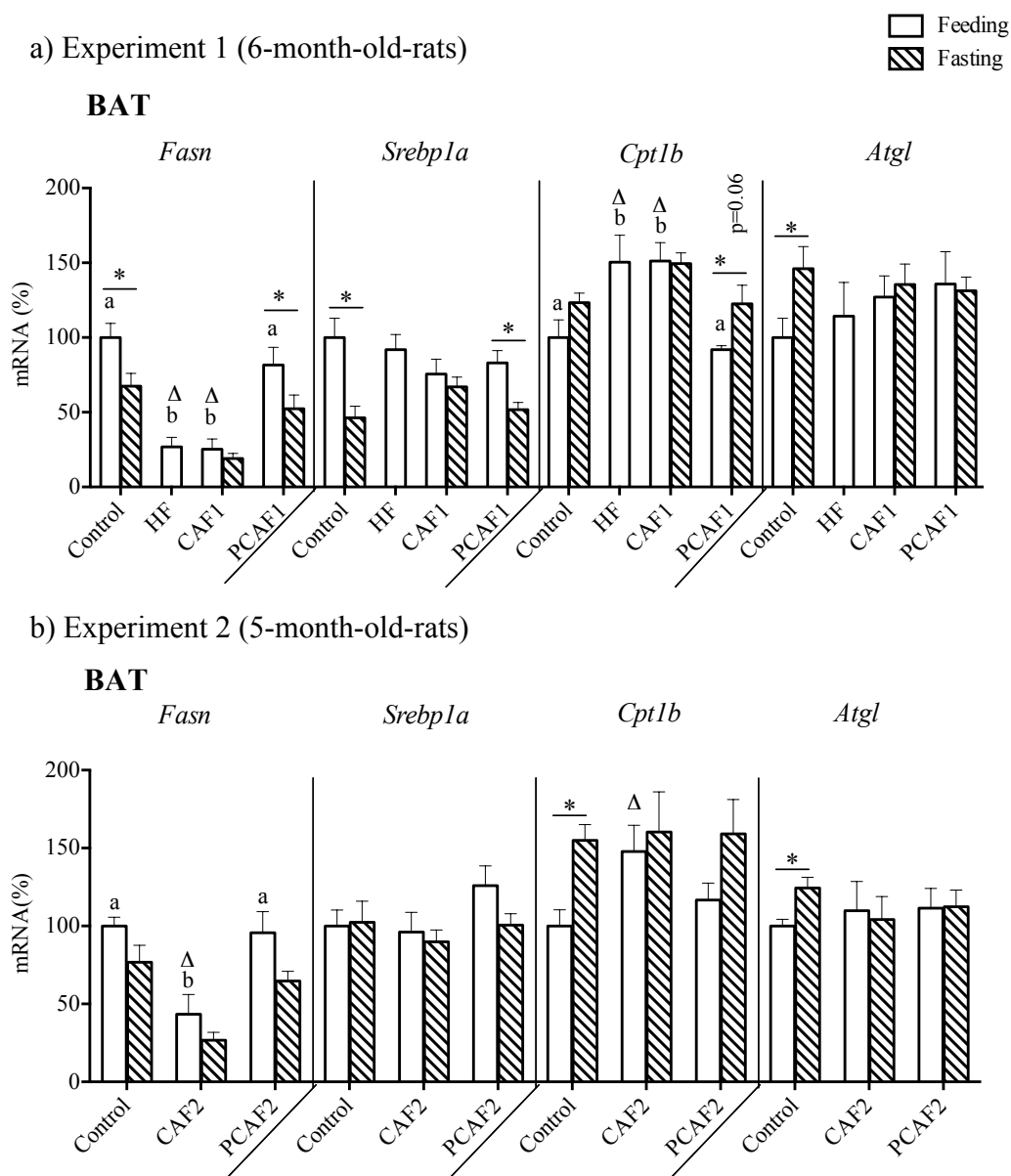
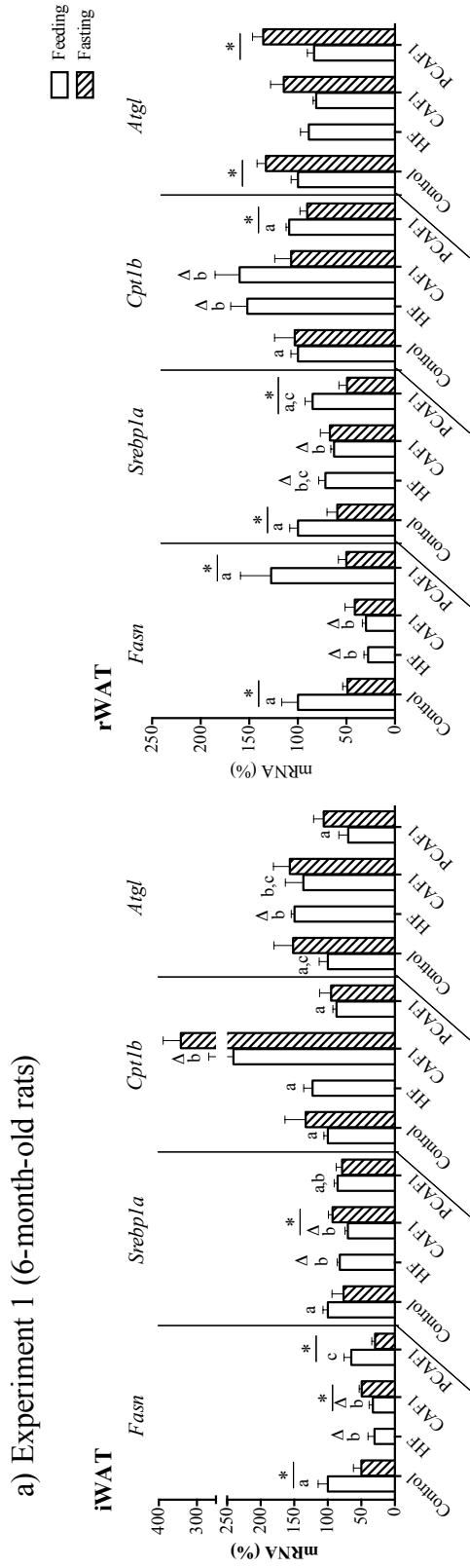


Figure 3. Expression of genes involved in energy homeostasis (*Fasn*, *Srebp1a*, *Cpt1b*, *Atgl* and *Slc27a2*) in brown adipose tissue (BAT) measured in the same animals described in Figure 2.



b) Experiment 2 (5-month-old rats)

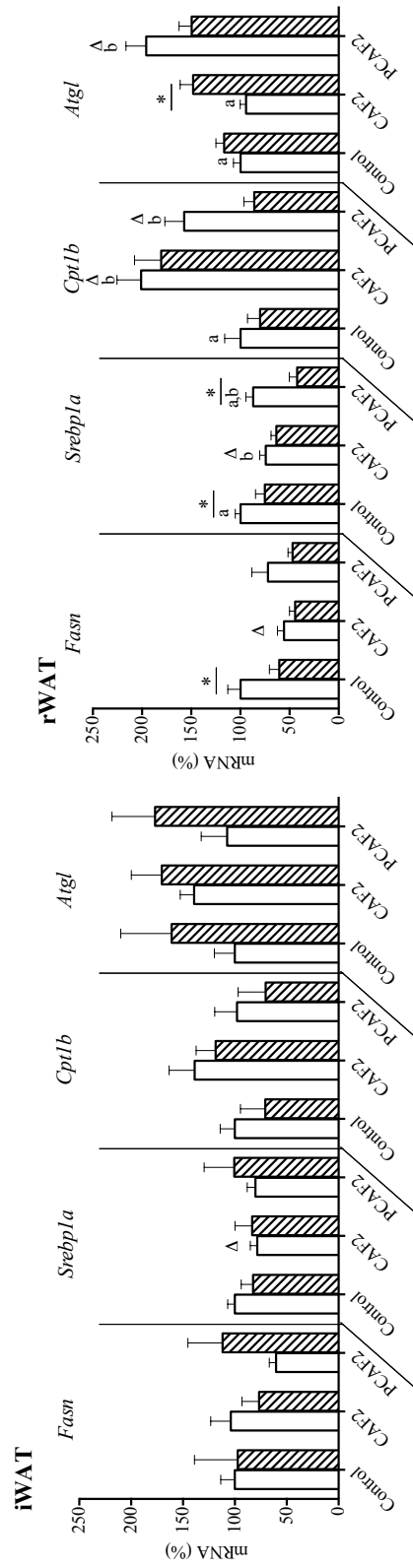


Figure 4. Expression of genes involved in energy homeostasis (*Fasn*, *Srebp1a*, *Cpt1b*, and *Atgl*) in inguinal (iWAT) and retroperitoneal (rWAT) white adipose tissue depots measured in the same animals described in Figure 2.

5.- Discussion

For scientific purposes, it is of great interest to have animal models that reflect the effect of human obesity on body weight, serum parameters and gene expression. In the last decades, there have been large amounts of research using different hyperlipidic diets to induce obesity in rodents (Caimari et al., 2010b; Coelho et al., 2011; Priego et al., 2009). Most of the studies use commercial high fat diets, although the use of a cafeteria diet has been proposed to be the one which better mimics human obesity (Sampey et al., 2011). We directly compared the use of a commercial high fat diet and a cafeteria diet in order to induce obesity and related metabolic complications in rats and we focused in the possibility of reversing increased body weight and its associated metabolic alterations caused by the consumption of a cafeteria diet when replacing it with a standard diet.

5.1.- Obesity induced by cafeteria diet is a robust obesity model

The two hyperlipidic diets studied, commercial high fat and cafeteria, provided a high percentage of energy as fat (60%) and a similar fatty acid composition. Their administration to adult rats for 4 months induced greater adiposity (more marked for the cafeteria diet) due to the increase in the weight of visceral and subcutaneous white adipose tissue depots. This increased adiposity resulted in hyperleptinemia in the fed state only in the cafeteria-fed animals, according to greater fat mass accumulation. Moreover, only the cafeteria diet produced weight gain which appeared rapidly after the administration of the diet, and reached 37% excess in comparison to controls. This difference can be attributed to the fact that animals fed on a commercial high fat diet decrease their food intake in terms of total grams to maintain the caloric intake like control animals (Sampey et al., 2011). In our animals, energy intake per day during the first month of diet was higher in the HF group, but was equal between the control and the HF group during the following 2 months and even decreased on the last month of diet administration. However, as we have previously reported (Ribot et al., 2008), cafeteria diet induces voluntary hyperphagia and grossly elevates fat intake. Both diets produced a decrease in circulating triacylglycerols, due to a reduction in very low density lipoprotein production rate and an increase in triacylglycerol removal from blood (Guo et al., 2009). However, our results show that the cafeteria diet produces greater metabolic alterations, inasmuch as only this diet promoted hyperglucemia, insulin resistance and impaired glucose tolerance. As revealed by histological analysis, cafeteria-fed but not HF-fed animals showed a high degree of liver microvesicular steatosis, specifically third degree, characterized by an abnormal accumulation of numerous small cytoplasmic lipid droplets in hepatocytes (Jolly et al., 2004). Increased fat consumption in humans is also associated with non-alcoholic fatty liver disease (Asrih and Jornayvaz, 2013; Younossi et al., 2011). All these data taken together confirm that obesity induced by the intake of cafeteria diet reflects better human obesity compared with HF diet.

A recent study (Sampey et al., 2011) compared a less severe commercial high fat diet (45% calories from fat) with cafeteria diet in terms of adiposity and serum parameters. In this study, we also compared the metabolic impact of both diets on lipid metabolism gene expression in important tissues involved in energy homeostasis maintenance. Our results show that cafeteria and commercial high fat diets had a deep impact on mRNA expression of lipogenic and lipolytic genes, and caused comparable effects, which are interpreted to reduce fat accumulation and to increase fatty acid

mobilization. As expected (Oliver et al., 2013), the intake of diets with an increased fat proportion inhibited the expression of lipogenic genes, as *Fasn*, coding for fatty acid synthase, main enzyme involved in fatty acid synthesis, and *Srebp1a* which codes for a key lipogenic transcription factor, in liver, white and brown adipose tissue depots. Also as expected from obesity conditions (Oliver et al., 2013), we observed increased mRNA expression of key lipolytic genes in response to the studied hyperlipidic diets: *Cpt1* coding for the enzyme carnitine palmitoyltransferase 1, involved in fatty acid transport across the inner mitochondrial membrane for beta-oxidation, and *Atgl* which codes for adipose triglyceride lipase, involved in the first step of lipolysis. The increased expression of these genes in liver, muscle, brown and white adipose suggests an increase in fatty acid oxidation and fatty acid mobilization. In liver we also studied the expression of *Fgf21* which codes for fibroblast growth factor 21 recently involved in hepatic fatty acid oxidation mediated by ‘Peroxisome proliferator-activated receptors α ’ (Woo et al., 2013). *Fgf21* mRNA levels had a huge increase but only in animals fed a cafeteria diet.

5.2.- Metabolic alterations associated with consumption of the cafeteria diet are reversible

In terms of obesity treatment, it is important to understand whether the significant alterations produced by cafeteria diet feeding are reversible. However, conflicting reports exist, and the degree of weight loss after withdrawal of the cafeteria diet is very variable (Levin and Dunn-Meynell, 2002; Ong et al., 2013; Rolls et al., 1980; South et al., 2012). Differences can be due to factors ranging from gender, strain and age of the laboratory rats used, to diet composition (both of the cafeteria and the control reversal diets) and to duration and severity of obesity.

In the present study we show that metabolic alterations related to increased adiposity can be reverted when the cafeteria diet has been administered to adult animals (2-month-old rats). The degree of recovery (total or partial) was dependent on the time of administration of the cafeteria diet and of the subsequent balanced control diet. Feeding with a control diet for 2 months after 2 months of cafeteria-feeding allowed an important decrease in overweight, although body weight of controls was not completely reached. However, the size of the different adipose depots (except the retroperitoneal) and adiposity indicators were recovered. Circulating glucose levels in the fed state returned to basal levels and glucose tolerance levels were similar to those of control animals, but HOMA-IR was not yet completely reverted, indicating insulin resistance. Liver lipid content was similar to that of controls and liver morphology was normal (no evidence of hepatic steatosis). For a shorter time of dietary treatment (control diet for 1.5 months after 1.5 months of cafeteria diet), body weight was totally reverted to that of control animals, and the same happened with adiposity and all the altered parameters related to glucose tolerance and insulin sensitivity. Other authors have also reported the importance of the length of time and of the amount of overweight gained on the cafeteria diet when considering its reversibility (Rogers, 1985). In fact, prolonged exposure to cafeteria diet could be responsible of the persistence of obesity reported in some studies after diet withdrawal (Harrington and Coscina, 1983; Rolls et al., 1980). At gene expression level, as shown in the previous section, cafeteria diet intake had an important impact on the expression of genes involved in lipid metabolism. In general terms, and regardless of time of administration of the diet, we observed a decreased expression of lipogenic (*Fasn* and *Srebp1a*) and an increased expression of lipolytic genes (*Cpt1*, *Atgl* and *Fgf21*). Our

results show that reversion to a control diet allowed a recovery of mRNA basal levels of the genes affected by the intake of the cafeteria diet.

Fasting produces important metabolic adaptations to maintain energy homeostasis. Circulating parameters such as leptin, glucose, insulin and triglyceride levels decrease as a metabolic adaptation to fasting conditions (Caimari et al., 2008; Palou et al., 2008; Palou et al., 2010a). Fasting also affects the expression of genes involved in lipid metabolism: as an adaptive response to food deprivation, a decrease in the expression of lipogenic and an increase in the expression of lipolytic genes occur (Oliver et al., 2013; Palou et al., 2008). As a general trend, the expected fasting response in circulating parameters and gene expression was observed for the genes studied in the different tissues analysed in control animals. However, obesity is related to insensitivity in fasting response, which contributes to increased adiposity (Caimari et al., 2008; Oliver et al., 2013). Our cafeteria-obese rats presented impaired fasting response for the circulating parameters studied and for gene expression. Interestingly, in liver, where *Cpt1a* expression has a strong nutritional regulation, we can observe how the increase induced by fasting disappeared in animals that were fed a cafeteria diet for 4 months, but was still maintained in animals that received the cafeteria diet for 3 months. This indicates how longer cafeteria diet exposure leads to greater metabolic deregulation. On the other hand, reversion of cafeteria diet to a control diet allowed recovery of fasting response in serum parameters and also at gene expression level (depending on the previous time of administration of the diet), indicating metabolic recovery associated to weight loss.

Contrary to what we describe here when cafeteria diet is administered to adult animals, previous studies from our group analysing the reversion of cafeteria to a standard diet have shown an inability to revert increased adiposity and different alterations caused by prolonged intake of this diet since early life (during the sucking period) (Lladó et al., 1991; Matamala et al., 1996; Proenza et al., 1992; Rodríguez et al., 2003); obesity induced by sustained feeding on a cafeteria diet at an early age is made permanent in spite of later prolonged adherence to a control diet. Dietary experiences occurring early in life are known to produce a permanent imprinting in the genome and to affect body weight regulation (Pico and Palou, 2013). This metabolic imprinting could be related to a greater difficulty to revert diet-induced obesity. Intriguingly, it has recently been reported that withdrawal of cafeteria diet after 2 months of administration initiated after weaning is able to reverse metabolic alterations after only one week (Lalanza et al., 2014). It is known that switching from a palatable cafeteria diet to control chow diet produces hypophagia which is initially more severe (Rogers, 1985). According to our results, post-cafeteria animals presented a significant lower caloric intake during the first 18-19 days after the intake of cafeteria diet. Taking this into account, results of Lalanza et al. (Lalanza et al., 2014) could be reflecting the effects of severe hypophagia in the first week of cafeteria diet removal. Also of note, previous studies from our group using older animals (5 or 8 months old) show an important recovery of body weight in post-cafeteria rats, but overweight is still present (Lladó et al., 1996; Proenza et al., 1992; Puigserver et al., 1991); the advanced age of the animals could also be affecting results. Hence, age is an important factor to take into account in studies of body weight loss after intake of an obesogenic diet.

5.3.- Conclusion

Here we demonstrate that when the cafeteria diet is administered to adult animals, its replacement by a balanced diet enables the recovery of body weight and adiposity, metabolic damage (insulin resistance, impaired glucose tolerance and hepatic steatosis), gene expression regulation, and fasting sensitivity. Degree of recovery is dependent on the previous time of administration of the cafeteria diet, but metabolic improvement is evident even if body weight is not completely recovered. The interest toward the potential extrapolation to be checked in humans is that the duration of the obesogenic diet, and also the age of administration seem to be key factors to determine effectiveness and degree of benefits of the adherence to a recovered balanced diet.

Manuscrito 3/Manuscript 3

Peripheral blood mononuclear cells as a potential source of biomarkers to test the efficacy of weight-loss strategies

Reynés, B., Díaz-Rúa, R., Cifre, M., Oliver, P., Palou, A.

Obesity, 8 Oct 2014 [Epub ahead of print]

Title page

Title: Peripheral blood mononuclear cells as a potential source of biomarkers to test the efficacy of weight-loss strategies

Authors: Bàrbara Reynés, Rubén Díaz-Rúa, Margalida Cifre, Paula Oliver*, Andreu Palou

Affiliation: Laboratory of Molecular Biology, Nutrition and Biotechnology (LBNB), Universitat de les Illes Balears and CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERobn), Palma de Mallorca, Spain.

Address correspondence to: Dr. Paula Oliver, Laboratory of Molecular Biology, Nutrition and Biotechnology, Universitat de les Illes Balears. Cra. Valldemossa Km 7.5. E-07122-Palma de Mallorca, Spain. Teléfono: +34 971172548. Fax: +34 971173426. E-mail: paula.oliver@uib.es

Running title: PBMC and weight loss

Author contribution: Paula Oliver and Andreu Palou conceived the experiment. Bàrbara Reynés did the major part of the experimental work. Rubén Díaz-Rúa and Margalida Cifre were involved in experimental work. Bàrbara Reynés and Paula Oliver wrote the article and Andreu palou participated in critical revising of the manuscript.

Acknowledgements: This work was supported by the projects EPIMILK -AGL2012-33692 and BIOCLAIMS -FP7-244995. CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición is an initiative of the ISCIII.

Conflict of interest: None

1.- Abstract

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) constitute an easily obtainable blood cell fraction useful in nutrition and obesity studies. Our aim was to study the potential use of PBMC to reflect metabolic recovery associated to weight loss in rats. By real-time PCR, the fasting response of key energy homeostatic genes in PBMC samples of control and cafeteria-obese rats and of rats fed a control diet after the intake of a cafeteria diet (post-cafeteria model) was analysed. Fasting caused decreased mRNA expression of lipogenic (*Fasn* and *Srebp1a*) and adipogenic (*Ppar γ*) genes in PBMC, whereas it increased the expression of the key beta-oxidation gene *Cpt1a* and the orexigenic gene *Npy*. Fasting response of the genes studied was impaired in cafeteria-obese animals but was recovered in post-cafeteria rats, which showed a significant body weight decrease and normalization of adipose and metabolic parameters. *Npy* expression analysed in PBMC has been revealed to be especially useful as a marker of fasting sensitivity, as its fasting response is not affected by the age of the animals and it is recovered even after shorter time of exposure to a balanced diet. PBMC reflect homeostatic balance recovery associated with weight loss in obese animals, when reverting from a hyperlipidic to a control balanced diet.

2.- Introduction

Because of the large increase in obesity-morbidities, there is great interest in metabolic recovery when adopting a healthy balanced diet (Aranceta Bartrina, 2013). The post-cafeteria model is very useful to study recovery associated to weight loss. It consists of feeding animals with a highly-palatable varied hyperlipidic diet, the cafeteria diet, to induce metabolic alterations, and then replacing it with a control balanced one (Lladó et al., 1991; Rodríguez et al., 2003). Although weight loss studies can be performed directly in humans, the typically obtained parameters do not completely reflect metabolic status, as molecular and metabolic information of key tissues involved in body weight control are missing. Animal models give the opportunity to test other sources of biomarkers which could reflect overall response of the body, including that of key tissues. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) are increasingly used as a source of biomarkers because their gene expression is representative of whole metabolic status (Liew et al., 2006). We previously reported that these cells can reflect response to changes in feeding conditions (fasting/re-feeding), gene expression changes related to obesity and metabolic deregulation characteristic of this pathology, like insensitivity to feeding conditions (Caimari et al., 2010a; Caimari et al., 2010b, d; Oliver et al., 2013). Moreover, PBMC and total blood cells have been proven of interest in human studies (Hermsdorff et al., 2010; Sánchez et al., 2012).

Here we aimed to evaluate whether PBMC are able to reflect metabolic recovery associated to weight loss in post-cafeteria animals, so that they could be used as a source of biomarkers to test the efficacy of weight-loss strategies.

3.- Methods

3.1.- Experimental design

Two experimental designs were performed. In Experiment 1, 2-month-old male Wistar rats were fed for 4 months with a control or a cafeteria diet (CAF1 group) or with a cafeteria diet for 2 months followed by control diet for other 2 months (PCAF1). In Experiment 2, animals were fed a control or a cafeteria diet (CAF2) for 3 months or with a cafeteria diet for 1.5 months followed by control diet for other 1.5 months (PCAF2). The control diet contained 10% calories from fat (Ref. D12450B, Research Diets, Brogaarden, Denmark). Cafeteria diet composition has been previously described (Caimari et al., 2010c; Oliver et al., 2013) and, based on the foodstuffs ingested by the animals, provides 62% calories from fat (Ribot et al., 2008). At the end of the experimental period, each group of rats was divided into two subgroups subjected to different conditions (n=6 for each condition): *ad libitum* feeding or nocturnal 14-h fasting. Blood samples were collected from the saphena vein, and PBMC were isolated as previously described (Oliver et al., 2013). In Experiment 2 hypothalamus was harvested.

3.2.- Real-time reverse transcriptase PCR

Real-time PCR was carried out to determine mRNA expression levels of key energy homeostatic genes. About 80 ng of total RNA from PBMC and 250 ng from hypothalamus were reverse transcribed to cDNA, and PCR was performed from diluted (1/5 for PBMC and 1/10 for hypothalamus) cDNA template as previously described (Oliver et al., 2013). Primers for the different genes are described in Supplementary Table.

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Amplicon size (bp)
<i>Cpt1a</i>	GCTCGCACATTACAAGGACAT	TGGACACCACATAGAGGCAG	250
<i>Fasn</i>	CGGCGAGTCTATGCCACTAT	ACACAGGGACCGAGTAATGC	222
<i>Npy</i>	TGGACTGACCCTCGCTCTAT	GTGTCTCAGGGCTGGATCTC	188
<i>Ppary</i>	AGAGCCTTCAAACCTCCCTCA	GAGACATCCCCACAGCAAG	230
<i>Srebp1a</i>	CCCACCCCCTTACACACC	GCCTGCGGTCTTCATTGT	198
<i>Gdil</i>	CCGCACAAGGCAAATACATC	GACTCTCTGAACCGTCATCAA	159
<i>(reference gene)</i>			

Supplementary Table. Nucleotide sequences of primers used for RT-PCR amplification and size of the PCR products. *Cpt1a*: carnitine palmitoyl transferase 1; *Fasn*: fatty acid synthase; *Gdil*: guanosine diphosphate dissociation inhibitor 1 (reference gene); *Npy*: neuropeptide Y; *Ppary*: peroxisome proliferator activated receptor gamma; and *Srebp1a*: sterol regulatory element-binding protein 1

3.3.- Statistical analysis

Two-way ANOVA followed by LSD *post-hoc* test was used to analyse the effect of the different diets and feeding conditions. Statistical significance of the different experimental groups vs. control was also analysed using Student's *t* test. Analyses were performed with SPSS for windows (SPSS, Chicago, IL). Threshold of significance was defined at $p < 0.05$.

4.- Results

4.1- Animal and serum parameters

Data regarding body weight, adiposity and circulating parameters of the same cohort of animals have been previously described (Reynés et al., In press). Briefly (Table 1), animals fed with cafeteria diet for 4 (CAF1) or 3 months (CAF2), presented increased body weight and higher adiposity index. Reversion to a control diet allowed complete recovery of adiposity index in PCAF animals, although body weight was completely reverted only in PCAF2. Cafeteria animals presented metabolic alterations: increased HOMA-IR and impaired fasting response of circulating parameters (glucose, insulin and leptin). Normalization of HOMA-IR and recovery of fasting response was observed in PCAF animals, especially in the PCAF2 group.

		Experiment 1 (6-month-old rats)			Experiment 2 (5-month-old rats)			
		Control	CAF 1	PCAF 1	Control	CAF 2	PCAF 2	
Body weight (g)		486 ± 9 ^a	668 ± 23 ^{b,Δ}	534 ± 17 ^{c,Δ}	496 ± 12 ^a	645 ± 29 ^{b,Δ}	503 ± 16 ^a	
Adiposity index (%)		8.96 ± 0.95 ^a	18.5 ± 2.0 ^{b,Δ}	11.8 ± 1 ^a	10.8 ± 0.5 ^a	17.7 ± 0.5 ^{b,Δ}	10.9 ± 1.1 ^a	
Glucose (mg/dl)	Feeding	108 ± 3 ^a	120 ± 2 ^{b,Δ}	113 ± 6 ^a	114 ± 5 ^a	137 ± 3 ^{b,Δ}	116 ± 3 ^a	DxF
	Fasting	97.6 ± 2.3 [*]	110 ± 3	115 ± 7	97.7 ± 3.3 [*]	107 ± 3 [*]	110 ± 5	
Insulin (µg/l)	Feeding	2.44 ± 0.44	2.83 ± 0.36	2.29 ± 0.33	1.86 ± 0.16	2.38 ± 0.45	1.82 ± 0.33	F D,F
	Fasting	0.62 ± 0.09 [*]	1.83 ± 0.5	0.86 ± 0.24 [*]	0.60 ± 0.05 [*]	1.48 ± 0.13	0.61 ± 0.08 [*]	
Leptin (µg/l)	Feeding	14.4 ± 2.6 ^a	43.2 ± 2.5 ^{b,Δ}	12.3 ± 2.1 ^a	12.1 ± 1.1 ^a	26.1 ± 1.2 ^{b,Δ}	10.5 ± 1.8 ^a	D,F
	Fasting	8.50 ± 0.72 [*] (* , p=0.08)	35.6 ± 4.5	9.55 ± 2.30	3.83 ± 0.62 [*]	20.3 ± 2.5	6.25 ± 1.24 [*] (* , p=0.08)	
HOMA-IR		3.90 ± 0.76 ^a	7.42 ± 1.48 ^{b,Δ}	6.98 ± 1.07 ^{ab,Δ}	5.16 ± 0.90 ^a	8.21 ± 1.01 ^{b,Δ}	6.04 ± 1.20 ^{ab}	

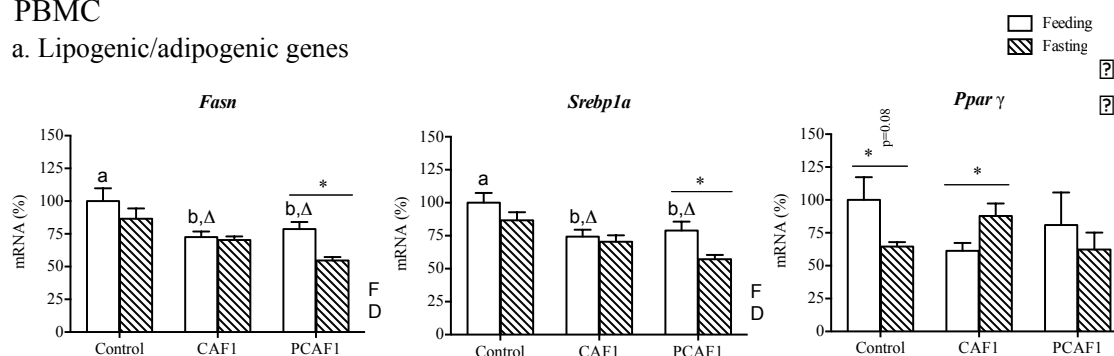
Table 1. Body weight and serum parameters in 6-month (Experiment 1) and 5-month-old animals (Experiment 2) submitted to different diets and feeding conditions (feeding and fasting). Results represent mean ± SEM (n=6). Two-way ANOVA was performed taking into account fed and fasted animals of the different experimental groups. One-way ANOVA was performed for parameters measured only in fed conditions. D, effect of the different diets (control, cafeteria or post-cafeteria); F effect of feeding conditions (feeding or fasting); DxF, interactive effect. Data not sharing a common letter (a, b, c) are significantly different. LSD post-hoc was used after the ANOVA analysis. Δ vs. control animals; * fasted vs. control fed animals (Student's *t* test). P<0.05 or indicated when different.

4.2.- Nutritional regulation of key energy homeostatic genes in PBMC

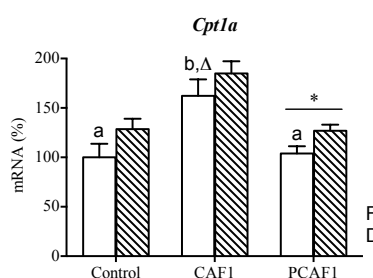
Four-month cafeteria-diet feeding (CAF1 group) decreased PBMC expression of fatty acid synthesis genes (*Fasn* and *Srebp1a*), while increased expression of the fatty acid beta-oxidation gene, *Cpt1a* (Figure 1). Reversion to a control diet (PCAF1) recovered basal expression of *Cpt1a*, but not of lipogenic genes. According to its metabolic function, in control animals (6-month old), fasting produced a three-time increased expression of the orexigenic *Npy* gene. We also observed a non-significant decrease in *Fasn*, *Srebp1a* and *Pparγ* and an increase in *Cpt1a* gene expression with fasting. Fasting regulation was lost in cafeteria-fed and recovered in PCAF1 animals for *Npy* and for *Fasn*, *Srebp1a* and *Cpt1a*, even if fasting response for these last three genes had not reached statistical significance in control animals.

PBMC

a. Lipogenic/adipogenic genes



b. Lipolytic gene



c. Food intake control gene

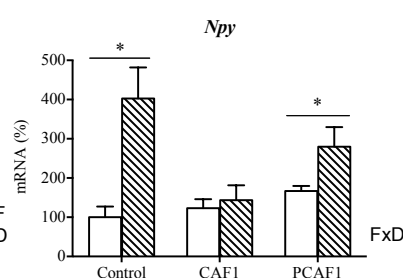


Figure 1. Expression of genes involved in energy homeostasis (*Fasn*, *Srebp1a*, *Ppar γ* , *Cpt1a* and *Npy*) in PBMC of 6-month-old control, cafeteria (CAF1) and post-cafeteria (PCAF1) fed and fasted Wistar rats, measured by real-time PCR. Results represent mean \pm SEM (n=6) of ratios of specific mRNA levels relative to *Gdi* (reference gene), expressed as a percentage of the value of fed animals in the control group that was set to 100%. Statistics: same as described in Table 1.

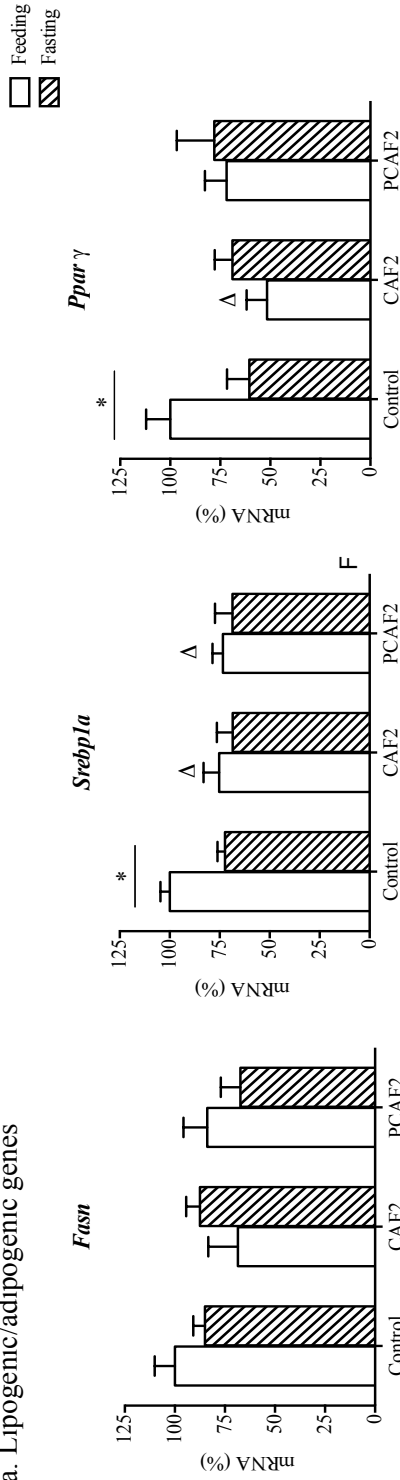
A shorter cafeteria-diet feeding period, 3 months, produced similar effects on basal gene expression (Figure 2): decreased expression of *Srebp1a* and *Ppar γ* and overexpression of *Cpt1a* (p=0.08, Student's *t* test). Again, reversion to a control diet shifted *Cpt1a* expression, but not of the lipogenic gene *Srebp1a*. In control animals (5-months old), fasting induced a twofold increase in mRNA levels of the orexigenic gene, *Npy*. We also observed increased expression of *Cpt1a* and decreased expression of *Srebp1a* and *Ppar γ* . This fasting regulation was lost in the cafeteria group and recovered in the post-cafeteria animals for *Npy* and *Cpt1a*.

4.3.- Regulation of *Npy* mRNA expression by fasting in hypothalamus

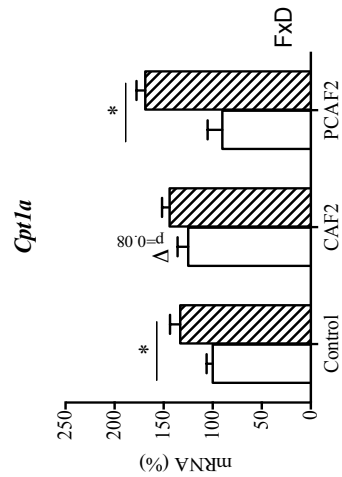
We previously compared fasting response in PBMC with that of liver and adipose tissue (Caimari et al., 2010a; Oliver et al., 2013). Here, we studied whether PBMC reflected hypothalamus fasting response. We analysed *Npy* expression in hypothalamus from Experiment 2. A tendency to higher *Npy* mRNA levels was observed in hypothalamus of control fasted animals, which was lost in cafeteria-obese animals (Figure 2). As observed in PBMC, *Npy* fasting response was recovered in the post-cafeteria group (Figure 2).

PBMC

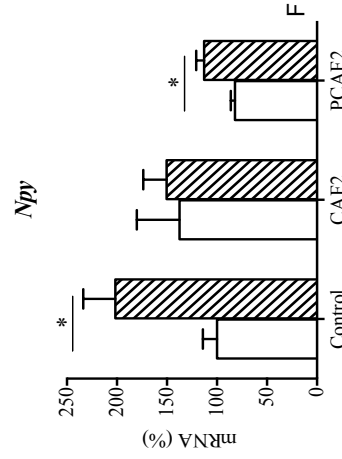
a. Lipogenic/adipogenic genes



b. Lipolytic gene



c. Food intake control gene



Hypothalamus

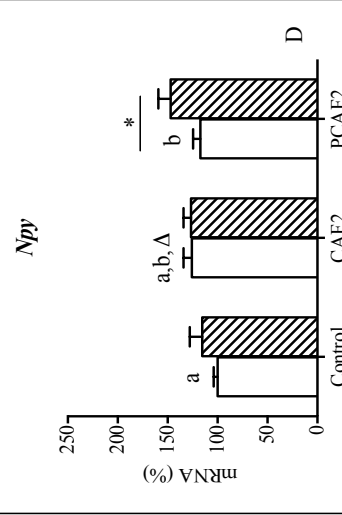


Figure 2. Expression of genes involved in energy homeostasis in PBMC (*Fasn*, *Srebp1a*, *Pparγ*, *Cpt1a* and *Npy*) and hypothalamus (*Npy*) of 5-month-old control, cafeteria (CAF2) and post-cafeteria (PCAF2) fed and fasted Wistar rats, measured by real-time PCR. Results represent mean ± SEM (n=6) of ratios of specific mRNA levels relative to *Gdi* (reference gene), expressed as a percentage of the value of fed animals in the control group that was set to 100%. Statistics: same as described in Table 1.

5.- Discussion

We studied the utility of PBMC as biological material to be used in the analysis of metabolic recovery, based on their ability to reflect homeostatic balance improvement when exchanging an obesogenic cafeteria diet for a control balanced one.

As expected (Caimari et al., 2010a; Oliver et al., 2013), PBMC reflected nutritional response to fasting characteristic of tissues such as liver or adipose tissue. As a general trend, 14-h fasting decreased expression of fatty acid synthesis genes, *Fasn* and *Srebp1a*, and also of *Ppar γ* , coding for a transcription factor involved in adipogenesis; while increased *Cpt1a* expression, coding for a key enzyme in fatty acid beta-oxidation. In 5-month-old rats all gene expression changes (except for *Fasn*) reached statistical significance, but this did not happen in 6-month-old rats. Thus, PBMC could be reflecting impairment in the response to changes in feeding conditions associated to aging which we have described in adipose tissue for animals older than 5 months (Caimari et al., 2008). Cafeteria diet intake impaired PBMC fasting response independently of the time of administration of the diet (3 or 4 months). However, reversion to a control diet produced a recovery in feeding sensitivity, which was more evident for animals in which the control diet was administered for a longer period of time. The most robust and outstanding results were those obtained for *Npy*. This gene plays a key role in food intake control, as it codes for the most potent orexigenic neuropeptide, neuropeptide Y, widely expressed in hypothalamus (Kmiec, 2006). We previously reported that *Npy* is expressed in PBMC and is regulated by fasting (Caimari et al., 2010a; Oliver et al., 2013). In accordance with its role, *Npy* mRNA levels in PBMC increased in response to fasting; the increased expression was of high magnitude and independent of the age of the animals. This fasting regulation was lost in cafeteria fed animals and recovered in post-cafeteria rats regardless of time of administration of the control balanced diet. When comparing to hypothalamus fasting response, *Npy* mRNA levels were not significantly increased in this tissue, probably due to the high duration of food deprivation (14 h). We previously reported that increased fasting *Npy* expression in hypothalamus is transitory (it becomes significant after 4-h fasting and decreases afterwards) (Palou et al., 2009b). However, as observed in PBMC, in hypothalamus, *Npy* response to feeding was completely lost in cafeteria-fed animals and recovered in the post-cafeteria group.

In addition to fasting response, PBMC reflected alterations in basal gene expression associated to the intake of a cafeteria diet which occurs in liver and adipose tissue of the same animals (Reynés et al., In press) to compensate the high dietary fat content: decreased expression of lipogenic (*Fasn* and *Srebp1a*) and adipogenic (*Ppar γ*) genes and increased *Cpt1a* expression. Reversion to a control diet recovered basal expression levels for *Cpt1a*, whereas expression of the lipogenic genes remained decreased.

In conclusion, PBMC reflect recovery of fasting sensitivity in post-cafeteria animals, which correlates with body weight loss and metabolic normalization when adopting a control balanced diet. The most robust results are those obtained for *Npy*. Thus, we propose analysis of PBMC gene expression, and particularly of *Npy*, as a tool to study metabolic recovery in weight loss program interventions.

Manuscrito 4/Manuscript 4

**The intake of high fat diets induces an obesogenic profile in peripheral blood
mononuclear cells**

Reynés, B., García-Ruíz, E., Palou, A., Oliver, P.

Title page

Title: The intake of high fat diets induces an obesogenic profile in peripheral blood mononuclear cells

Authors: Bàrbara Reynés, Estefanía García-Ruíz, Andreu Palou*, Paula Oliver

Affiliation: Laboratory of Molecular Biology, Nutrition and Biotechnology, Universitat de les Illes Balears and CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERobn), Palma de Mallorca, Spain

Address correspondence to: Prof. Andreu Palou Oliver, Laboratory of Molecular Biology, Nutrition and Biotechnology, Universitat de les Illes Balears. Cra. Valldemossa Km 7.5. E-07122-Palma de Mallorca, Spain. Phone: +34971173071. Fax: +34971173426. E-mail: andreu.palou@uib.es

Author contribution: Paula Oliver and Andreu Palou conceived the experiment. Bàrbara Reynés did the major part of the experimental work. Estefanía García-Ruiz was involved in experimental work. Bàrbara Reynés and Paula Oliver wrote the article and Andreu Palou participated in critical revising of the manuscript.

Running title: PBMC and obesogenic profile

Acknowledgements: CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición is an initiative of the ISCIII. This work was supported by the EU FP7 project BIOCLAIMS -FP7-244995. Laboratory of Molecular Biology, Nutrition and Biotechnology is a member of the European Research Network of Excellence NuGO (The European Nutrigenomics Organization, EU Contract: FOOD-CT-2004-506360 NUGO). Authors belong to the Nutrigenomics-group, awarded as “Group of Excellence” of CAIB and supported by “Direcció General d’Universitats, Recerca i Transferència del Coneixement” of Regional Government (CAIB) and FEDER funds (EU). EGR is recipient of a fellowship from the University of the Balearic Islands.

Conflict of interest: None

1.- Abstract

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) constitute a useful biological material for nutrigenomics studies as they can reflect metabolic response to different diets, nutritional compounds or feeding conditions (feeding/fasting). This article aimed to identify if PBMC could be useful to reflect the development of an obesogenic profile associated to the intake of high fat diets. We analysed by real-time RT-PCR dietary response of key genes related to lipid metabolism (*Cpt1a*, *Fasn* and *Srebp1a*), obesity (*Apob48r*, *Cebpb* and *Slc27a2*) and inflammation (*Il-6* and *Tnfa*) in PBMC samples of control rats, rats fed cafeteria or a commercial high fat diet, and rats fed a control diet after the intake of a cafeteria diet (post-cafeteria model). Cafeteria diet intake, which resulted in important overweight and related complications, altered the expression of most of the studied genes in PBMC, evidencing the development of an obesogenic profile. The intake of a commercial high fat diet, which produced metabolic alterations but in the absence of increased body weight, also altered PBMC gene expression, inducing a similar regulatory pattern as that observed for the cafeteria diet. Regulation of *Cpt1* mRNA expression resulted of special interest. Expression of this gene reflected metabolic alterations related to the intake of both obesogenic diets (linked or not to increased body weight) even in an early stage, as well as metabolic recovery after withdrawal of a cafeteria diet. In conclusion, PBMC constitute an important source of biomarkers, which reflect increased adiposity and metabolic deregulation associated to the intake of high fat diets. Particularly, we propose analysis of *Cpt1a* expression as a good biomarker to detect early metabolic alterations caused by the consumption of hyperlipidic diets, even in the absence of increased body weight, as well as a marker of metabolic recovery associated to weight loss and metabolic recovery.

2.- Introduction

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) represent a fraction of white blood cells composed by monocytes and lymphocytes. In addition to their role in immunity, PBMC possess specific characteristics that made them an interesting biological material to be used in the search of molecular biomarkers, including early biomarkers of disease. PBMC can express a large proportion of the genome (Liew et al., 2006) and can be easily and repeatedly collected in sufficient quantities to perform transcriptomics analysis, in contrast to the more invasive sampling of liver, adipose tissue or the other tissues (de Mello et al., 2012). They have a fast turnover and are in continuous interaction with the entire body, so that they can reflect gene expression profiles of certain pathologies and can be used for clinical diagnosis (Cappuzzello et al., 2009; Goleva et al., 2012; Zeng et al., 2013). Moreover, PBMC can response to hormonal changes reflecting metabolic response of different organs, as they possess receptors for hormones such as insulin, glucagon or leptin (Goldstein et al., 1975; Powers et al., 1980) (Goldstein et al., 1975; Neal et al., 1983; Tsiotra et al., 2000).

Recently, PBMC have become a key target for nutrigenomic studies. It is well known that PBMC can reflect the metabolic effect of different diets, for example hyperlipidic diets, on gene expression, especially on lipid and cholesterol metabolism and on inflammatory genes (Caimari et al., 2010b; de Mello et al., 2012; Oliver et al., 2013). These cells can also respond to specific nutrients, such as polyunsaturated fatty acids, polyphenols or L-carnitine (Bouwens et al., 2009; Radler et al., 2011; Rudkowska et al., 2011) and to changes in feeding conditions (fasting/re-feeding) (Bouwens et al., 2007; Caimari et al., 2010a; Caimari et al., 2010b; Oliver et al., 2013). PBMC are also a good biological material to perform obesity studies, pathology which is linked to a pro-inflammatory state (Xu et al., 2003). In humans, obesity and diabetes affect PBMC gene expression, of different cytokines, such as resistin, tumor necrosis factor- α (*Tnf- α*) and interleukin-6 (*Il-6*) (Tsiotra et al., 2008; Tsiotra et al., 2007). Additionally, we have previously described that these cells reflect alterations related to diet-induced obesity, such as the impairment in the response to feeding conditions, even in early stages of body weight gain (Caimari et al., 2010b; Oliver et al., 2013), as well as metabolic recovery associated to weight loss (Reynés et al., 2014b). In fact, we have previously presented PBMC as source of obesity biomarkers (Caimari et al., 2010c).

Our previous studies analysing the effect of high fat diets on PBMC gene expression have been mainly based in the study of genes involved in lipid metabolism. The aim of this research is to study a pool of obesity biomarkers, linked to different processes related to obesity development (lipid metabolism, obesity regulation and inflammation), which could be altered in response to the intake high fat diets, in an early stage. Description of early biomarkers of obesity is extremely useful in terms of development of prevention strategies aimed to maintain a proper body weight.

3.- Methods

3.1.- Animals, diets and experimental design

The animal protocol followed in this study was reviewed and approved by the Bioethical Committee of the University of the Balearic Islands, following its guidelines for the use and care of laboratory animals.

Two-month-old male Wistar rats (Charles River Laboratories España, SA, Barcelona, Spain) were distributed into groups fed for 4 months with different diets: a control group (Control; n=6) fed with a control diet (with 10% Kcal from fat) (Ref. D12450B, Research Diets, Brogaarden, Denmark); a high fat group (HF n=7) fed with commercial hyperlipidic diet (with 60% Kcal from fat) (Ref. D12492, Research Diets, Brogaarden, Denmark); a cafeteria group (CAF; n=6) fed with cafeteria diet (with 62% Kcal from fat) plus control diet (Caimari et al., 2010c; Oliver et al., 2013) and a post-cafeeteria group (PCAF; n=6) fed during 2 months with cafeteria diet plus control diet, and then other 2 months exclusively with control diet. The gross composition of the cafeteria diet was detailed in previous studies (Reynés et al., 2014; Ribot et al., 2008), while detailed composition of the control and commercial high fat diets is available in the web site of Research Diets Inc. Animals were housed in pairs at 22°C with a period of light/dark of 12 h. Food and water were offered *ad libitum* and body weight was followed twice a week.

3.2.- PBMC isolation

From the age of 2 till the age of 6 months, blood samples (1.5-2.5 ml) were monthly collected in *ad libitum* conditions from the saphena vein, using heparin in NaCl (0.9%) as anticoagulant. After blood collection, PBMC were isolated by Ficoll gradient separation, according to the instructions indicated by manufacturer (GE Healthcare Bio Sciences, Barcelona, Spain), with some modifications. Briefly, the anticoagulant-treated blood was diluted with an equal volume of balanced salt solution, which was prepared by mixing two stock solutions (1/10); solution A (5.5 mM anhydrous D-glucose, 5 mM CaCl₂ 2H₂O, 0.98mM MgCl₂ 6H₂O, 5.4mM KCl, 145 mM Tris) and solution B (140 mM NaCl). Afterwards, the blood was layered carefully over Ficoll without intermixing (1.5ml of Ficoll for 2 ml of blood mixed with balanced salt solution) in a centrifuge tub and centrifuged at 900g for 40 min at 20°C. PBMC, together with platelets, were harvested from the interface between Ficoll and sample layers. This material was then centrifuged in balanced salt solution at 400 g for 10 min at 20°C to wash PBMC and to remove the platelets. Monthly, blood samples were also collected from saphena vein, stored at room temperature for 1 h, and then centrifuged at 1000g for 10 min at 4°C to collect the serum.

3.3.- Measurement of adiposity, circulating parameters and insulin resistance (HOMA-IR)

Fat mass was determined using an EcoMRI-700TM (Echo Medical Systems, LLC, TX, USA). Lipid content in liver was determined using the Folch method (Folch et al., 1957). Circulating glucose, leptin and triacylglycerols were measured in serum samples obtained at the end of the experimental period. Glucose concentration was measured using an Accu-Chek Glucometer (Roche Diagnostics, Barcelona, Spain); leptin concentration using a rat insulin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and triacylglycerols using an enzymatic colorimetric kit (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO, USA). HOMA-IR calculated from fasting insulin and glucose concentration using the formula of Matthews et al. (Matthews et al., 1985) to assess insulin resistance.

3.4.- Total RNA isolation and real-time reverse transcriptase

Total RNA from PBMC samples was extracted using Tripure Reagent (Roche Diagnostics, Barcelona, Spain), and then purified with E.Z.N.A. MicroElute RNA Clean Up (Omega Biotek, Vermont, USA). RNA yield was quantified on a NanoDrop ND 1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) and its integrity was confirmed using agarose gel electrophoresis.

3.5.- Real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis

Real-time RT-PCR was carried out to determine mRNA expression levels of genes related to obesity in PBMC samples. 80 ng of total RNA was denatured at 90°C for 1 min and then reverse transcribed to cDNA using MuLV reverse transcriptase (Applied Biosystems, Madrid, Spain) at 42°C for 60 min and a final step of 5 min at 99°C in an Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler.

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Amplicon size (pb)
<i>Apob48r</i>	GGGCTACATCAGGCTTTGAG	TTCCTCCCCTACAACCTTC	150
<i>Cebpβ</i>	GAGCGACGAGTACAAGATGCGG	TTGTGCTGCGTCTCCAGGTTG	96
<i>Cpt1a</i>	GCTCGCACATTACAAGGACAT	TGGACACCACATAGAGGCAG	250
<i>Fasn</i>	CGGCGAGTCTATGCCACTAT	ACACAGGGACCGAGTAATGC	222
<i>Il-6</i>	ATATGTTCTCAGGGAGATCTTGAA	GTGCATCATCGCTGTTTCATACA	79
<i>Slc27a2</i>	TTTCAGCCAGCCAGTTTTG	TCTCCTCGTAAGCCATTTCC	157
<i>Srebp1</i>	CCCACCCCTTACACACC	GCCTGCGGTCTTCATTGT	198
<i>Tnfa</i>	CCGATTTGCCATTTTCATACC	TCGCTTCACAGAGCAATGAC	237
<i>Gdi</i> (reference gene)	CCGCACAAGGCAAATACATC	GACTCTCTGAACCGTCATCAA	159

Table 1. Nucleotide sequences of primers and amplicon size used real-time RT-PCR amplification.

Each PCR was performed from diluted (1/5) cDNA template, forward and reverse primers (5 μM) and Power SYBER Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) in a total volume of 11μl, with the following profile: 10 min at 95°C, followed by a total of 40 temperature cycles (15s at 95°C and 1 min at 60°C) with a final cycle of 15s at 95°C, 1 min at 60°C and 15s at 95°C. In order to verify the purity of the products, a melting curve was produced after each run according to the manufacture's instructions. The threshold cycle (Ct) was calculated by the instrument's software (StepOne Software v2.0, from Applied Biosystems) and the relative expression of each mRNA was calculated as a percentage of controls rats, using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (Pfaffl, 2001). Data were normalized against the reference gene guanosine diphosphate dissociation inhibitor 1 (*Gdi1*). *Gdi1* was chosen based on microarray data which show its stability in control and diet-induced obese animals (Caimari et al., 2010a). Primers for the different genes are described in Table 1. All

primers were obtained from Sigma Genosys (Sigma Al-drich Química SA, Madrid, Spain).

3.6.- Statistical analysis

All data are expressed as the mean \pm s.e.m. Differences between groups were analysed using ANOVA and LSD post-hoc was used when differences were statistically significant ($p < 0.05$). The effect of fasting was analysed using Student's *t*-test. The analyses were performed with SPSS for windows (SPSS, Chicago, IL, USA). Threshold of significance was defined at $p < 0.05$, and is indicated when is different.

4.- Results and discussion

The study of molecular biomarkers in PBMC opens new ways towards developing less invasive techniques in the prevention and detection of diseases. This study provides evidences that PBMC reflect metabolic adaptations to increased adiposity induced by the intake of hyperlipidic diets during development, by analysing gene expression of selected genes, which could be used as early obesity biomarkers.

4.1.- Body weight, adiposity and circulating parameters

As we have previously described using the same set of animals (Reynés et al., 2014), rats fed a cafeteria diet for 4 months attained a 37% overweight at the end of the experimental period and, according to higher adiposity, presented increased serum leptin levels, as well as decreased circulating triacylglycerols due to a reduction in very low density lipoprotein production rate and an increase in triacylglycerol removal from blood (Guo et al., 2009). These animals had drastic alterations related to metabolic syndrome, including hyperglycaemia, insulin resistance (evidenced by increased HOMA index), and increased liver lipid content (Table 2). However, animals fed a commercial high fat diet did not have a significant increased body weight, but had increased fat mass and metabolic alterations, although not so marked than those observed with cafeteria diet feeding. In these animals, as happened in cafeteria animals, we observed increased circulating leptin, lower circulating triacylglycerol levels and increased fat deposition in liver. Animals of the post-cafeteria group had an important decrease in body weight but, even if adiposity was recovered, excessive body weight was not completely reverted. PCAF animals displayed an important improvement in their metabolic parameters, normalization in serum leptin, glucose, and triacylglycerol levels, and normalization of liver lipid content.

	Control	HF	CAF	PCAF
Weight (g)	486 ± 9 ^a	502 ± 10 ^{a,b}	668 ± 23 ^{cΔ}	534 ± 17 ^{bΔ}
% fat mass	22.5 ± 1.2 ^a	35.2 ± 2.0 ^{bΔ}	46.3 ± 1.2 ^{cΔ}	26.2 ± 1.7 ^a
Leptin (µg/l)	14.4 ± 2.6 ^a	19.7 ± 1.4 ^{aΔ} (Δ, p=0.08)	43.2 ± 2.5 ^{bΔ}	12.3 ± 2.1 ^a
Glucose (mg/dl)	108 ± 3	114 ± 4	120 ± 2 ^Δ	113 ± 6
Triacylglycerols (mg/ml)	2.05 ± 0.15 ^a	1.56 ± 0.19 ^b	1.06 ± 0.11 ^{cΔ}	3.07 ± 0.21 ^d
HOMA-IR	3.90 ± 0.76	4.60 ± 1.02	7.42 ± 1.48 ^Δ	6.98 ± 1.07 ^Δ
Liver lipid content (mg/g tissue)	12.9 ± 3.7 ^a	36.8 ± 4.5 ^{aΔ}	101 ± 24 ^{bΔ}	24.3 ± 8.2 ^a

Table 2. Body weight, fat mass and serum parameters in animals submitted to different diets. HF animals were fed a commercial high fat diet for 4 months, CAF animals were fed a cafeteria diet for 4 months and PCAF animals with a cafeteria diet for 2 months and with a control diet for 2 months more. Results represent mean ± SEM (n=6-7). One-way ANOVA was performed taking into account fed or fasted animals. Data not sharing a common letter (a, b, c) are significantly different (p<0.05). DMS post-hoc was used after the ANOVA analysis. Δ also indicates effect of different diets vs control diet (Student's *t*-test, p<0.05).

This experimental design resulted of special interest as we can compare the effect of two hyperlipidic diets, both causing health problems, but one of them, the commercial high fat diet, not associated to increased body weight. Moreover, the post-cafeteria model gives the opportunity to analyse body weight loss and its consequent metabolic recovery.

4.2.- Regulation of mRNA expression by the intake of hyperlipidic diets in PBMC

PBMC constitute a good source to identify biomarkers. Here, we have compared the effect on PBMC gene expression of the two studied hyperlipidic diets, a cafeteria diet and a commercial high-fat diet, both providing a similar fat proportion to the animals, around 60% of calories. Specifically, we aimed to identify markers of adiposity in PBMC in our animals, preferably early markers. To that purpose we analysed the alterations in the expression of a set of selected (involved in lipid metabolism, obesity and inflammation), after chronic intake of both diets, at different times of diet exposure. Our data indicate that PBMC reflected adaptations and deregulations related to increased adiposity induced by the intake of hyperlipidic diets (especially cafeteria diet) during development. Additionally, PBMC reflected recovery of altered gene expression related to weight loss and metabolic normalization.

4.2.1.- Lipid metabolism genes

Proper lipid metabolism regulation is crucial to handle with an excessive intake of hyperlipidic diets. Coincident to what observed in key energy homeostatic tissues of the same animals (Oliver et al., 2013; Reynés et al., 2014; Rodríguez et al., 2004), the intake of the high fat diets studied increased expression of a key beta-oxidation gene (*Cpt1a*) while inhibited expression of key lipogenic genes (*Srebp* and *Fasn*) in PBMC, reflecting a physiological adaptation to increased fat intake. *Cpt1a*, codes for an enzyme with enables the entrance of long-chain fatty acids across the inner mitochondrial membrane for subsequent beta-oxidation. Its mRNA expression resulted of special interest to be considered as a marker of adiposity as it was equally increased as result of the intake of both hyperlipidic diets (commercial high fat and cafeteria) at the age of 4 months (after 2 months of diet), and this increased expression was maintained one month later. Unexpectedly, at the end of the experimental *Cpt1a* expression was only observed in PBMC of the cafeteria-fed animals. Interestingly, altered *Cpt1a* expression levels were recovered in the PCAF group.

We also analyzed the expression of two lipogenic genes, *Fasn* and *Srebp1a*. *Fasn* codes for fatty acid synthase, an enzyme directly involved in fatty acid synthesis, and *Srebp1a* codes for a transcription factor critical for the expression of numerous genes involved in fatty acid synthesis. It is well described that expression of lipogenic genes is decreased by high fat diet feeding, to decrease the *de novo* lipogenesis promoting in this way the use the fatty acids from diet (Horton and Shimomura, 1999). Both high fat diets studied decreased *Fasn* and *Srebp* mRNA expression, however this decrease was not observed until the end of the experimental period (after 4 months of dietary treatment). Moreover, the expression of these genes was not recovered after withdrawal of the cafeteria diet.

Thus, according to our data, only *Cpt1a* gene expression is revealed as a potential early marker of increased adiposity regardless of body weight, as animals fed

a cafeteria diet were obese, and not those fed a commercial high fat diet, although both diets produce decreased *Cpt1a* expression. Additionally, *Cpt1a* could also be useful as a marker of metabolic recovery related to weight loss.

Lipid metabolism

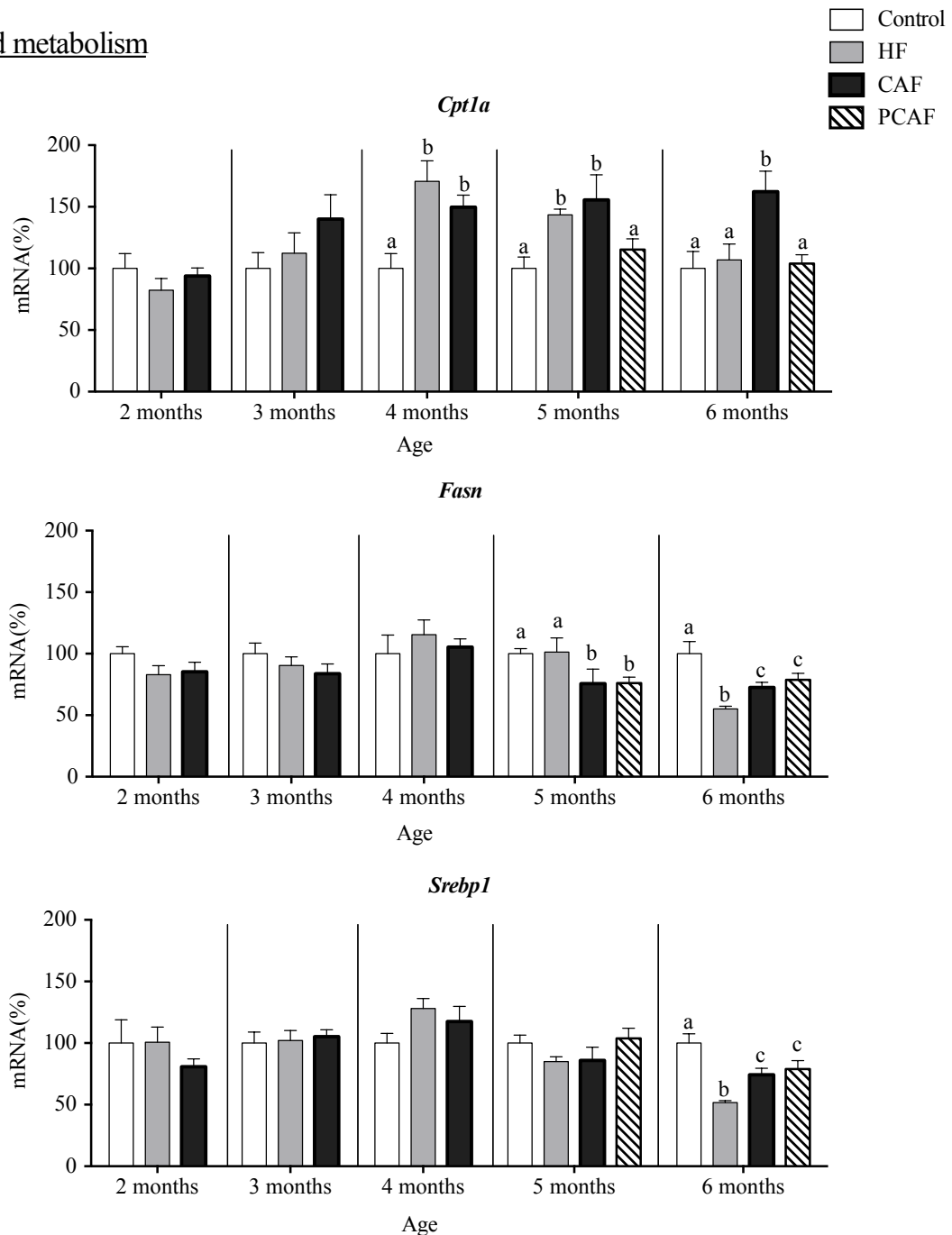


Figure 1. Expression of genes involved in lipid metabolism (*Cpt1a*, *Fasn* and *Srebp1*) in PBMC of control, HF, CAF, and PCAF groups of Wistar rats at different ages of diet administration (from 2 to 6 months), measured by real-time RT-PCR. Results represent mean \pm SEM (n=6-7) of ratios of specific mRNA levels relative to *Gdi*, expressed as a percentage of the value of fed animals in the control group that was set to 100%. One-way ANOVA was performed for each age. Data not sharing a common letter (a, b, c) are significantly different (p<0.05). LSD post hoc test was used after ANOVA analysis.

4.2.2.- Obesity-related genes

There are a wide number of genes available in literature whose altered expression is related to obesity, and are considered as obesity markers. To perform our study we selected three obesity-related genes which had been shown to be expressed in PBMC.

One of the selected genes was *apoprotein B48 receptor (Apob48r)* whose expression has been described to increase in monocytes after high fat feeding increasing lipid accumulation in these cells (Lumeng et al., 2007; Varela et al., 2011) and, thus, *Apob48r* is considered an obesity biomarker in PBMC (Gianturco et al., 1998). Our results show increased *Apob48r* expression in response to the two-hyperlipidic diets after two months of diet exposure (4-month-old animals), but this increased expression disappeared thereafter. Increased *Apob48r* expression after a high-fat meal has been shown to be time-dependent: it increases in the postprandial state and gene expression is recovered thereafter (Varela et al., 2011). Our results would indicate a response to the increased fat proportion of the diet after two months, followed by an adaptation and normalization of *Apob48r* expression.

Other gene defined as an obesity marker is *Cebpb* which encodes for a CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) β transcription factor, which is an important regulator in controlling lipid metabolism and in the development of diet-induced obesity (Millward et al., 2007). C/EBP β expression has been shown to be increased in liver, adipocytes, as well as in macrophages, in response to a high fat diet feeding, being responsible of dietary-induced inflammation in mice (Rahman et al., 2012). According to this, our results show how 3 and 4 months of cafeteria diet feeding increased PBMC *Cebpb* gene expression, while mRNA returned to basal levels in the post-cafeteria groups. Commercial high fat diet also induced increased *Cebpb* expression, but only after 4 months of diet administration.

Our group has previously presented analysis of *Slc27a2* expression in PBMC as a potential overweight biomarker associated to the intake of a cafeteria diet (Caimari et al., 2010c). This gene codes for solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 2 (FATP2), a free long-chain fatty acid transporter whose over-expression in liver is related to hepatic steatosis (Falcon et al., 2010). As we observed in our previous experiment (Caimari et al., 2010c), *Slc27a2* expression dramatically increased in PBMC of cafeteria-fed animals. This increased expression was present from the first month of dietary treatment (3 month-old animals), when animals only presented 18% increased body weight, and was maintained during the whole experimental period (37% increased expression at the end of the experimental period). On the contrary, surprisingly, no change in *Slc27a2* mRNA levels was observed in animals fed a commercial high fat diet. These data suggest that an increased expression of *Slc27a2* would be reflecting more an increased body weight and not the effect of the intake of a high fat diet *per se*. However, as increased fat content in diet produces metabolic alterations even in the absence of obesity, this gene would not be so interesting as a marker of disease or metabolic alterations as for example the previously commented *Cpt1*, whose expression was altered (increased in response to the intake of both hyperlipidic diets). Interestingly, *Slc27a2* was not reverted in the PCAF group, maybe due to the fact that post-cafeteria animals still maintain a percentage of increased body weight. Further studies are required to understand the important increase in the expression of this gene, exclusively in cafeteria-fed animals.

Obesity related genes

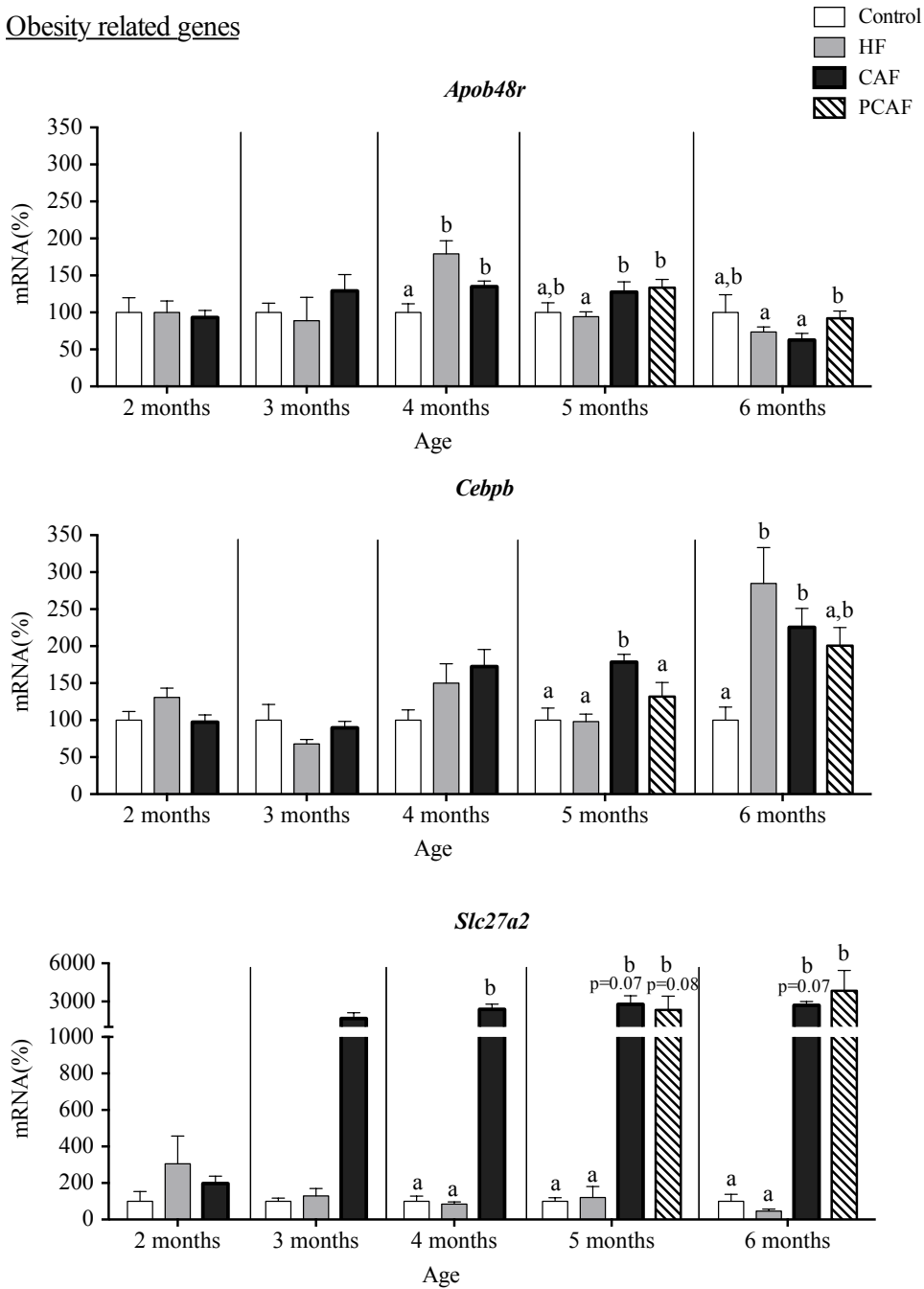


Figure 2. Expression of obesity-related genes (*Apob48r*, *Cebpb* and *Slc27a2*) in PBMC of control, HF, CAF, and PCAF groups of Wistar rats at different ages of diet administration (from 2 to 6 months), measured by real-time RT-PCR. Results represent mean \pm SEM (n=6-7) of ratios of specific mRNA levels relative to *Gdi*, expressed as a percentage of the value of fed animals in the control group that was set to 100%. One-way ANOVA was performed for each age. Data not sharing a common letter (a, b, c) are significantly different ($p < 0.05$ or indicated when different). LSD post hoc test was used after ANOVA analysis.

4.2.3.- Inflammatory genes

Obesity represents an expansion of adipose tissue mass characterized by state of chronic inflammation (Alokail et al., 2014; Fujimoto et al., 2010; Wang et al., 2014). Moreover, a proinflammatory state is positively correlated with obesity-related complications as type 2 diabetes and cardiovascular disease (Kern et al., 2003; Wang et al., 2014). Thus, gene expression analysis of inflammatory cytokines in immune cells can be used to identify a pro-inflammatory pattern related to obesity (Fjeldborg et al., 2014). We have analysed the expression of two well-known pro-inflammatory markers, interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF α), which are commonly involved in aetiology of obesity.

There is a lot of controversy on *Il-6* gene expression and obesity development. Even if *Il-6* mRNA levels increase in adipose tissue in an obesogenic state (Fjeldborg et al., 2014), different studies do not detect changes in *Il-6* gene expression in liver or in blood samples of obese subjects (Alokail et al., 2014; Sachithanandan et al., 2010). Our results in PBMC at different times of the intake of high fat diets did not show any conclusive result. Cafeteria diet feeding produced no change in *Il-6* expression, and the same happened for the commercial high fat diet, except at the end of the experimental period in which decreased *Il-6* mRNA levels were observed in the HF group.

As expected (Wang et al., 2014), *Tnfa* gene expression increased in PBMC of our cafeteria-obese animals; increased expression was observed from the age of 4 till the age of 6 months, that means, and was recovered in PCAF animals. Commercial high fat diet had a lower impact, increased *Tnfa* expression was only observed in 4 month-old animals (after 2 months of diet). According to these results, *Tnfa* gene expression reflects increased adiposity associated to the intake of a cafeteria diet, but not that related to the commercial high fat diet, related to lower adiposity and metabolic complications.

Inflammation

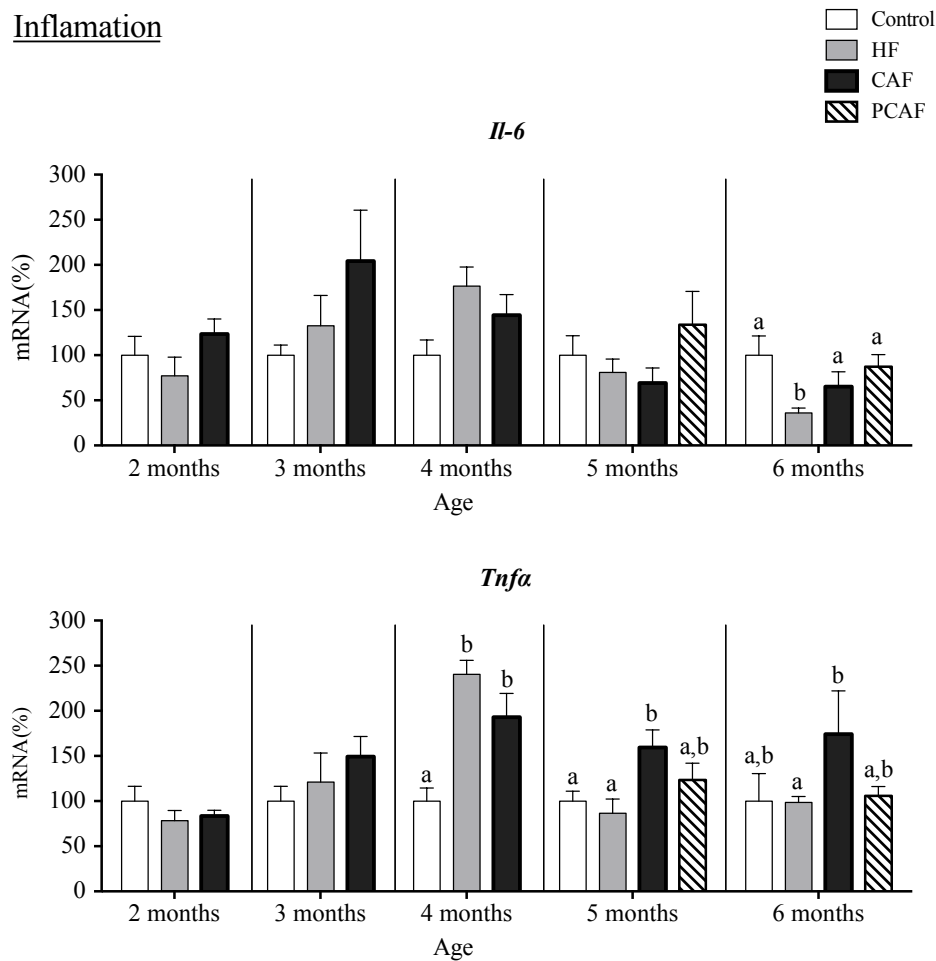


Figure 3. Expression inflammatory genes (*Il-6* and *Tnfa*) in PBMC of control, HF, CAF, and PCAF groups of Wistar rats at different ages of diet administration (from 2 to 6 months), measured by real-time RT-PCR. Results represent mean \pm SEM (n=6-7) of ratios of specific mRNA levels relative to *Gdi*, expressed as a percentage of the value of fed animals in the control group that was set to 100%. One-way ANOVA was performed for each age. Data not sharing a common letter (a, b, c) are significantly different ($p < 0.05$). LSD post hoc test was used after ANOVA analysis.

5.- Conclusion

PBMC are good source of biomarkers of a large amount of diseases. Our results clearly indicate that PBMC gene expression can reflect an obesogenic profile related to the intake of hyperlipidic diets, with alterations in genes involved in lipid metabolism regulation, in obesity-related genes and in inflammatory genes. Long-term cafeteria diet intake, associated to increased body weight and important metabolic deregulations, produced a higher impact in the studied genes in comparison a commercial high fat diet, related to increased adiposity and metabolic complications, but not to increased body weight. Moreover, we could observe a time-dependent effect on the studied biomarkers, some of them being altered in the beginning and others at the end of dietary treatment, the latter being representative of cumulative adiposity or metabolic damage. Gene expression of *Cpt1a* resulted of special interest as early predictive biomarker of increased adiposity and metabolic damage associated to high fat diet feeding, as well as of metabolic recovery associated to weight loss. Identification of new molecular biomarkers in blood samples is extremely useful to develop health preventive strategies.

Manuscrito 5/Manuscript 5

**Peripheral blood mononuclear cells express key genes involved in adipose tissue
browning and reflect white to brown adipose tissue remodelling capacity in
response to the intake of high fat diets**

Reynés, B., García-Ruíz, E., Díaz-Rúa, R., Ceresi, E., Oliver, P., Palou, A.

Title page

Title: Peripheral blood mononuclear cells express key genes involved in adipose tissue browning and reflect white to brown adipose tissue remodelling capacity in response to the intake of high fat diets

Authors: Bàrbara Reynés, Estefanía García-Ruiz, Rubén Díaz-Rúa, Enzo Ceresi, Paula Oliver*, Andreu Palou

Affiliation: Laboratory of Molecular Biology, Nutrition and Biotechnology (LBNB), Universitat de les Illes Balears and CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERObn), Palma de Mallorca, Spain.

Author contribution: Paula Oliver and Andreu Palou conceived the experiment. Estefanía García-Ruiz, Bàrbara Reynés and Rubén Díaz-Rúa performed the animal procedures. Estefanía García-Ruiz, Bàrbara Reynés and Enzo Ceresi were involved in the experimental work. Bàrbara Reynés and Paula Oliver wrote the article and Andreu Palou participated in critical review of the manuscript.

Running title: PBMC and browning induced by high fat diet intake

These results are part of this manuscript (to be submitted for publication):

Title: The intake of high fat diets induces the acquisition of brown adipocyte gene expression features in white adipose tissue

1.- Abstract

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) constitute an interesting biological material, as they can be easily and repeatedly collected with minimum invasion and reflect gene expression patterns, which occur in adipose tissue in response to stimulus such as diet. Our objective was to analyse the usefulness of PBMC to study adipose tissue browning induction in response to the intake of hyperlipidic diets. Two different hyperlipidic diets, a cafeteria diet and a commercial high fat diet, were administered for 4 months to male adult Wistar rats. Gene expression of key brown/brite markers was analysed by real-time RT-PCR in PBMC samples obtained at the end of the experimental period. We found detectable expression levels in PBMC of the brown markers: *Cidea*, *Ebf3*, *Eva1*, *Fbxo31*, *Fgf21* *Prdm16* and *Tbx15*. Detectable mRNA expression of *Cidea* and *Ebf3* was evident only in animals fed with the hyperlipidic diets, while *Fgf21* and *Prdm16* were expressed at basal levels in control animals and this expression increased as result of the intake of both high fat diets. No expression was found for *Pgc1a* or *Ucp1* either in control or high fat-fed animals. For brite markers, detectable expression was found for: *Hoxc9*, *Slc27a1* and *Tmem26*. *Hoxc9* was not affected by dietary treatment. However, as happened in white adipose tissue, both hyperlipidic diets produced increased expression of *Slc27a1*; a tendency to higher *Tmem26* expression in treated animals was also observed. We have shown that some key browning markers are expressed in PBMC and follow a similar regulatory behaviour to that observed in adipose tissue of animals fed high fat diets. The possibility of using PBMC to perform browning studies is extremely valuable as it opens the possibility to realize human interventions with minimum invasiveness.

2.- Introduction

Obesity has become a global public health crisis but current therapeutic strategies, based mainly in the control of food intake, seem to be inadequate (Hill et al., 2012). Obesity appears as a consequence of prolonged positive imbalance between energy intake and energy expenditure, with the excess of energy being stored as fat in white adipose tissue (WAT) (Jéquier, 2002). On the contrary, brown adipose tissue (BAT) has the remarkable ability to dissipate excess energy as heat in a process known as adaptive thermogenesis, activated in response to stimulus as hyperlipidic diets or cold (Cannon and Nedergaard, 2004). Uncoupling protein 1 (UCP1) expressed in the inner mitochondrial membrane of brown adipocytes is the molecular responsible of thermogenesis (Palou et al., 1998). Based on its energy dissipating role, BAT has an interest for body weight maintenance (Whittle et al., 2011). Taking this into account, the interest in a therapeutic strategy for body weight control based on increasing energy expenditure has re-emerged due to the discovery of inducible BAT in adult humans (Nedergaard et al., 2007; Saito et al., 2009).

Interestingly, brown-like adipocytes can appear in WAT depots in response to specific stimuli such as cold exposure or beta-adrenergic stimulation, in a process known as browning (Bonet et al., 2013; Lo and Sun, 2013). These cells have been also called “brite” (from brown-in-white) or “beige” adipocytes (Wu et al., 2012). As happens in brown adipocytes, brite cells store fat in multiple vacuoles in the cytoplasm (multilocular cells). Moreover, they express low levels of UCP1 but this inducible in response to appropriated stimulation which can turn on in these cells an energy expenditure similar to that of classic brown adipocytes (Petrovic et al., 2010). Taking this into account, in addition to the induction and activation of BAT thermogenesis, the induction of remodelling from white into brown adipose tissue could be a powerful strategy to combat obesity and related complications (Bonet et al., 2013; Sharp et al., 2012).

The intake of high fat diets is associated to increased adiposity and to the development of disorders related to metabolic syndrome, such as insulin resistance, hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia among others (Buettner et al., 2006; Dziedzic et al., 2007). In rodents, hyperlipidic diets are known to increase thermogenic capacity (BAT recruitment and activation) in an attempt to dissipate the excess energy intake and maintain body weight (Brooks et al., 1980; Rothwell and Stock, 1979). Nevertheless, the ability of high fat diets to induce WAT browning in rodents is controversial (Bonet et al., 2013; Fromme and Klingenspor, 2011; Hojna et al., 2012). In this sense, we have reported that the intake of high fat diets in rats produces an up-regulation of brown/brite markers in brown and white adipose tissues in an attempt to counteract increased adiposity (García-Ruiz et al.).

Adipose tissue gene expression studies require invasive tissue biopsies. Thus, it would be interesting to dispose of a different kind of biological material with a higher applicability to humans. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) constitute an easily and repeatedly obtainable biological material which are considered as a non-invasive source of biomarkers of whole body status (Liew et al., 2006). These cells are able to reflect health/disease status (Ratzer et al., 2013) and, in addition, they are able to reflect metabolic response to stimuli such as diet (de Mello et al., 2012) and, thus, they are of interest for energy homeostatic studies (Caimari et al., 2010a). Our objective was to analyse, in normal Wistar rats, the effect of two different hyperlipidic diets, a commercial high fat diet and a highly palatable cafeteria diet, on gene

expression of brown/brite adipocyte markers in PBMC to detect if these cells could be useful to perform BAT research.

3.- Methods

3.1.- Ethics statement

All animals experimental procedures followed in this study were reviewed and approved by the Bioethical Committee of the University of the Balearic Islands, and guidelines for the use and care of laboratory animals of the University were followed.

3.2.- Animals

We analysed browning capacity in male Wistar rats (Charles River Laboratories España, SA, Barcelona, Spain) from a previous study (Reynés et al., 2014). For the experimental design, 2-month-old animals were divided into four groups: a control (C; n=6), a high fat (HF; n=7), a cafeteria (CAF; n=6) and a post-cafeteria (PCAF; n=6) group, fed with different diets for 4 months. Control animals were fed a normolipidic diet (D12450B, Research Diets) containing 70% of energy (Kcal) from carbohydrates, 10% from fats and 20% from proteins. HF animals were fed a high-fat diet (D12492, Research Diets) containing 20% of energy from carbohydrates, 60% from fats (40% saturated and 60% unsaturated fat) and 20% from proteins. CAF animals were fed a cafeteria diet, which is a fat-rich hypercaloric diet containing the following foodstuffs: cookies with liver pate and sobrassada (a typical Majorcan sausage), candies, fresh bacon, biscuits, chocolate, salted peanuts, cheese, milk containing 20% (w/v) sucrose and ensaïmada (a typical Majorcan pastry). Cafeteria diet feeding is a well-established strategy to study obesity; it is a highly palatable hyperlipidic diet that mimics Western diet inducing voluntary hyperphagia and a rapid weight gain in rodents (Sampey et al., 2011). PCAF animal were fed a cafeteria diet for two months and then with a normolipidic diet for other two months. Animals were caged in groups of two.

Animals were sacrificed by decapitation and different white adipose tissue (WAT) depots, both visceral (retroperitoneal, mesenteric and epididymal) and subcutaneous (inguinal), as well as the interscapular brown adipose tissue (BAT) were rapidly removed, weighed and stored at -70 °C until analysis. Other key tissues in energy homeostasis control were collected as well. Truncal blood was collected from the neck, stored at room temperature for 1 h and centrifuged at 1000 g for 10 min at 4°C to collect serum. One week prior to sacrifice animals were submitted to nocturnal 14-h fasting to collect serum in fasted conditions to analyse the HOMA-IR score.

Data of body weight, adiposity and serum parameters, as well as mRNA expression of key energy homeostatic tissues of the same cohort of animals used in this study have been previously reported (Reynés et al., 2014). Table 1 shows the most relevant parameters. In brief, intake both hyperlipidic diets (specially the cafeteria diet) produced increased adiposity, although this was only related to a higher body weight in the cafeteria group, which presented a 37% overweight in comparison to control animals. Increased adiposity in both groups was due to an increase in the size of all the white adipose depots; however, an increased the size of BAT was only evident in the CAF group (data not shown). Concerning the PCAF group, adiposity index decreased to levels of the control animals, although body weight was not completely reverted (10% overweight). According to higher adiposity, circulating leptin levels were increased in the HF and CAF groups, while were recovered in the PCAF group indicating decreased adiposity. Cafeteria diet intake was related to insulin resistance, as evidenced by higher serum glucose levels and HOMA index.

	Control	HF	CAF	PCAF
Body weight (g)	486 ± 9 ^a	502 ± 10 ^{a,c}	668 ± 23 ^{b*}	534 ± 17 ^{c*}
Adiposity index (%)	8.96 ± 0.95 ^a	15.2 ± 0.5 ^{b*}	18.5 ± 2.0 ^{c*}	11.8 ± 1.0 ^d
Glucose (mg/dL)	108 ± 3	114 ± 4	120 ± 2 [*]	113 ± 6
Insulin (µg/L)	2.44 ± 0.44	1.86 ± 0.21	2.83 ± 0.36	2.29 ± 0.33
HOMA-IR	3.90 ± 0.76	4.60 ± 1.02	7.42 ± 1.48 [*]	6.98 ± 1.07 [*]
Leptin (µg/L)	14.4 ± 2.6 ^a	19.7 ± 1.4 ^a	43.2 ± 2.5 ^{b*}	12.3 ± 2.1 ^a

Table 1. Body weight, adiposity and circulating parameters. Data obtained in male Wistar rats fed during 4 months with a control, a commercial high fat (HF) or a cafeteria (CAF) diet, or with a control diet for 2 months after 2 months of cafeteria feeding (PCAF). The adiposity index was computed as the sum of epididymal, inguinal, mesenteric and retroperitoneal white adipose tissue depots weights and expressed as a percentage of total body weight. Glucose was measured using a glucometer. Insulin and leptin levels were measured by ELISA kits (from Mercodia AB and R&D Systems, respectively). HOMA-IR was computed using the formula of Matthews *et al.* Results represent mean ± SEM (n=6-7). Values not sharing a common letter (a, b, c) are significantly different (one-way ANOVA, p<0.05); * vs control group (Student's *t* test, p<0.05).

3.3.- PBMC isolation

Prior to the sacrifice of the animals, blood samples (1.5–2.5 mL) were collected from the saphena vein using heparin in NaCl (0.9%) as anticoagulant. Immediately after blood collection, PBMC were isolated by Ficoll gradient separation according to the instructions indicated by the manufacturer (GE Healthcare Bio Sciences, Barcelona, Spain), with some modifications (Caimari *et al.*, 2010c).

3.4.- Total RNA isolation

Total RNA from PBMC samples was extracted using TriPure reagent. Isolated RNA was quantified using the NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) and its integrity confirmed using 1% agarose gel electrophoresis.

3.5.- Real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (real-time RT-PCR) analysis

Gene expression of brown/brite adipocyte markers of interest was determined by real-time RT-PCR in PBMC. 80 ng for PBMC (in a final volume of 5 µL) were transcribed to cDNA and PCR was performed from 1/5 diluted cDNA template as previously described (Oliver *et al.*, 2013). The relative expression of each mRNA was calculated as a percentage of control rats, using Pfaffl's method (Pfaffl, 2001). Data were normalized against the reference gene guanosine diphosphate dissociation inhibitor 1 (*Gdi1*). *Gdi1* was chosen based on microarray data which show its stability in control and diet-induced obese animals (Caimari *et al.*, 2010b). Primers for different genes are described in table 2. Gene expression of the same markers analysed in

PBMC were previously determined in BAT and in retroperitoneal WAT (García-Ruiz et al.).

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Amplicon size (bp)
<i>Cidea</i>	TCAGACCCCTAAGAGACAACACA	CATTGAGACAGCCGAGGA	164
<i>Cd137</i>	AAGCAACCATTTAAGAAGGCGG	GGATGGCACATTACAGCTCG	115
<i>Ebf3</i>	ATGACCAAACAGGCCATCGT	GGGTCTGAGGGTGTTCGTT	140
<i>Eva1</i>	GGTCGTGAGCAGTTTGTATTC	CAGGTGTATGTCCCGTTGTC	158
<i>Fbxo31</i>	AGATCACACAGGATGTCCG	GTAGGTCAGGCAGTTGTCTG	160
<i>Fgf21</i>	ACAGATGACGACCAGGACAC	AGGCTTTGACACCCAGGATT	145
<i>Hoxc9</i>	CGGCAGCAAGCACAAAGA	AGAAACTCCTTCTCCAGTTCCA	138
<i>Pgc1a</i>	CATTTGATGCACTGACAGATGGA	CCGTCAGGCATGGAGGAA	70
<i>Prdm16</i>	ACGACCACCTCTGCTACCTC	GGGCTCTATTTTTGACCTTCT	216
<i>Slc27a1</i>	CAGGAGTGGAGGGGAAAG	CAGAAGACGCAGGAAGATGG	131
<i>Tbx1</i>	ACCCTCGAAAAGACAGCGAG	TGCGTGATCCGGTGATTCTG	109
<i>Tbx15</i>	GGATGAGACAGGTGGTCAGTT	CACAGGCACAGGTTTGGT	164
<i>Tmem26</i>	GCTGTTCTGTTCATTCCC	GGAGAAAGCCATTTGTAGCCTC	159
<i>Ucp1</i>	GGGCTGATTCCTTTGGTCT	GGTGGTGATGGTCCCTAAGA	229
<i>Gdi</i> (reference gene)	CCGCACAAGGCAAATACATC	GACTCTCTGAACCGTCATCAA	159

Table 2. Nucleotide sequences of primers and amplicon size used for real-time RT-PCR amplification. For brown markers: *Cidea*: cell death-inducing DNA fragmentation factor- α -like effector A; *Cd137*: also known as *Tnfrsf9*, tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9; *Ebf3*: early B cell factor-3; *Eva1*: epithelial V-like antigen 1; *Fbxo31*: F-box protein 31; *Fgf21*: fibroblast growth factor 21; *Hoxc9*: homeo box C9; *Pgc1a*: peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha; *Prdm16*: PR domain containing protein-16; *Slc27a1*: solute carrier family 27 (FATP1 fatty acid transporter), member 1; *Tbx1*: transcription factor T-box 1; *Tbx15*: transcription factor T-box 15 and *Tmem26*: transmembrane protein 26; *Ucp1*: uncoupling protein 1 and *Gdi1*: guanosine diphosphate dissociation inhibitor 1.

3.6.- Immunohistochemistry analysis of CIDE-A and UCP1 in BAT and WAT

Retroperitoneal WAT samples were fixed by immersion in 4% paraformaldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.4, overnight at 4°C, washed in phosphate buffer, dehydrated in a graded series of ethanol, cleared in xylene and embedded in paraffin blocks for light microscopy. Five-micrometers sections of retroperitoneal WAT of the different experimental groups were immunostained by means of the avidin-biotin technique (Hsu et al., 1981). Briefly, serial sections were incubated with normal goat serum 2% in PBS pH 7.3 to block unspecific sites and then overnight at 4°C with primary rabbit polyclonal UCP1 antibody (GeneTex International Corporation, CA, USA) diluted 1:300 in PBS and with CIDE-A primary rabbit polyclonal antibody (Sigma, St. Lois, MO, USA) diluted 1:150 in PBS. Sections were then incubated with the corresponding biotinylated anti-rabbit IgG secondary antibody (Vector Laboratories, Burlingame, CA), diluted 1:200, and finally with ABC complex (Vectastain ABC kit, Vector, CA, USA). Peroxidase activity was revealed with Sigma Fast 3,3'-diaminobenzidine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) as substrate. Finally, sections were counterstained with hematoxylin and mounted in Eukitt (Kindler, Germany). Images were acquired with a Zeiss Axioskop 2 microscope equipped with AxioCam ICc3 digital camera and AxioVision 40V 4.6.3.0 Software (Carl Zeiss, S.A., Barcelona, Spain). Immunohistochemistry analysis of UCP1 and

CIDE-A was performed in those groups in which multilocular adipocytes were observed.

3.7.- Statistical analysis

All data are expressed as the mean \pm SEM. Differences between groups were analysed using Student's *t* test or one-way ANOVA and least significant difference (LSD) post-hoc comparisons. The test used for each comparison is specified in the footnotes of the tables and figures. Analyses were performed with SPSS® for windows (SPSS, Chicago, IL, USA). Threshold of significance was defined at $p < 0.05$ and is indicated when different.

4.- Results and discussion

Apart from its thermoregulatory role, BAT thermogenesis induction could be important for body weight control in animals fed hypercaloric diets (Boss and Farmer, 2012). In fact, it is well known that high fat diets increase UCP1 mRNA and protein expression in BAT of rodents (Fromme and Klingenspor, 2011). We have also described that the intake of hyperlipidic diets produce an up-regulation of brown/brite markers in BAT and WAT, which is dependent on the type of WAT depot (García-Ruiz et al.). In an innovative manner, here we have performed a molecular characterization of the capacity of two different high fat diets (commercial HF and cafeteria diet) to induce the expression of brown/brite adipocytes markers in PBMC. To our knowledge, this is the first study analysing the potential of PBMC to reflect the browning induced by diet.

4.1.- Brown/brite adipocyte markers in brown and white adipose tissue

We have previously described the effect of the administration of hyperlipidic diets on mRNA expression of brown/brite adipocyte markers in BAT and retroperitoneal WAT (rWAT) of adult Wistar rats (García-Ruiz et al.). Briefly, in BAT, administration of a commercial high fat or a cafeteria diet produced increased *Cidea* and *Ucp1* mRNA expression. We also observed increased expression of other brown adipocyte markers, as *Ebf3* and *Tbx15*, but only in the CAF group. However, mRNA levels of *Prdm16*, *Eval*, *Fbxo31* and *Fgf21*, genes whose expression is enriched in BAT or have been associated to brown adipocyte differentiation, were not affected by the intake of the studied diets. Moreover, dietary treatment also affected gene expression of brown adipocyte markers in WAT. Particularly, in rWAT, both high fat diets induced increased *Fgf21* and *Tbx15* mRNA expression, while the expression of *Cidea*, which is highly expressed in BAT of rodents (Barneda et al., 2013), increased only in response to the intake of the cafeteria diet. In general, gene expression of studied genes was similar in the PCAF group to that of the control group with the exception of *Tbx15*, which codes for a transcription factor that seems to be essential for the enhancement of the brown phenotype in brown and brite adipocytes (Gburcik et al., 2012). The intake of high fat diets also affected the expression of genes considered as brite selective markers or which are enriched in WAT in response to stimulus that induce browning. Both hyperlipidic diets increased the expression of *Slc27a1* and *Tmem26* in rWAT. In BAT, *Hoxc9* and *Slc27a1* gene expression was detected, and *Slc27a1* was down regulated as result of the nutritional intervention (Figure 1). Thus, the intake of high fat diets produced an up-regulation of brown/brite markers in BAT and WAT. Intake of the cafeteria diet (associated to higher body weight gain) was related to a higher regulatory effect than the commercial HF diet. Moreover, the reversion of the cafeteria to a control diet restored most of the changes observed at molecular level.

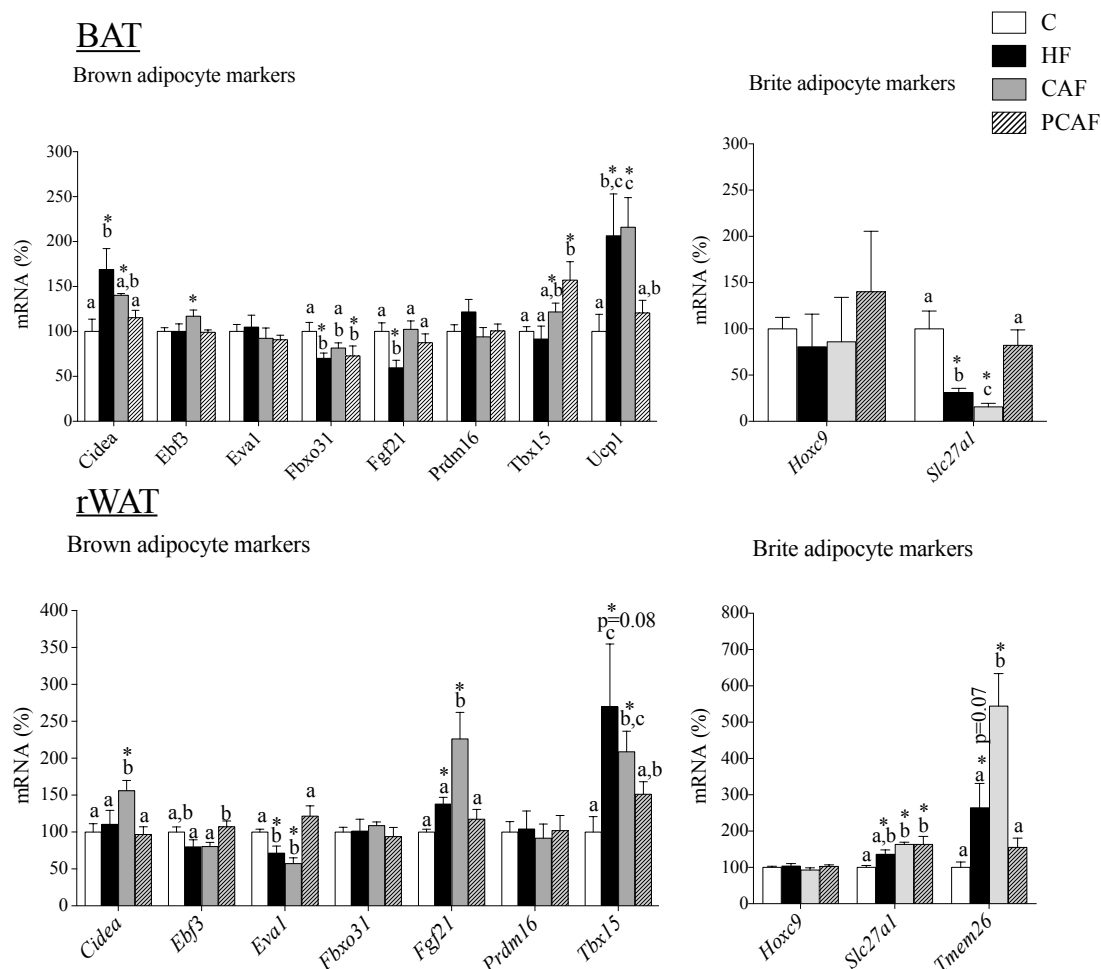


Figure 1. Gene expression of brown and brite markers in adipose tissue. mRNA levels of brite markers in: BAT and retroperitoneal WAT (rWAT), in the same animals and conditions described in Table 1. mRNA expression levels in the different tissues were measured by real-time RT-PCR. Results represent mean \pm SEM (n=6-7) of ratios of specific mRNA levels referred to *Gdi1* (used as reference gene). Data of the control group was set to 100% and the rest of the values are referred to this. Bars not sharing a common letter (a, b, c) are significantly different (one-way ANOVA, $p < 0.05$ and LSD post-hoc test). * vs control group (Student's *t* test, $p < 0.05$).

4.2.- CIDE-A and UCP1 immunohistochemistry in white adipose tissue

Gene expression changes observed at molecular level in rWAT suggested that brown adipocytes could have emerged in response to a chronic high fat diet feeding. To confirm browning induction we made morphological/immunohistochemical analysis of retroperitoneal WAT. Results evidence the presence of some multilocular UCP1 and CIDE-A positive cells dispersed among large unilocular white adipocytes in the rWAT of some cafeteria-fed and commercial HF-fed animals but not in control or PCAF animals (Figure 2). These results confirm the increased browning potential observed at gene expression level.

rWAT

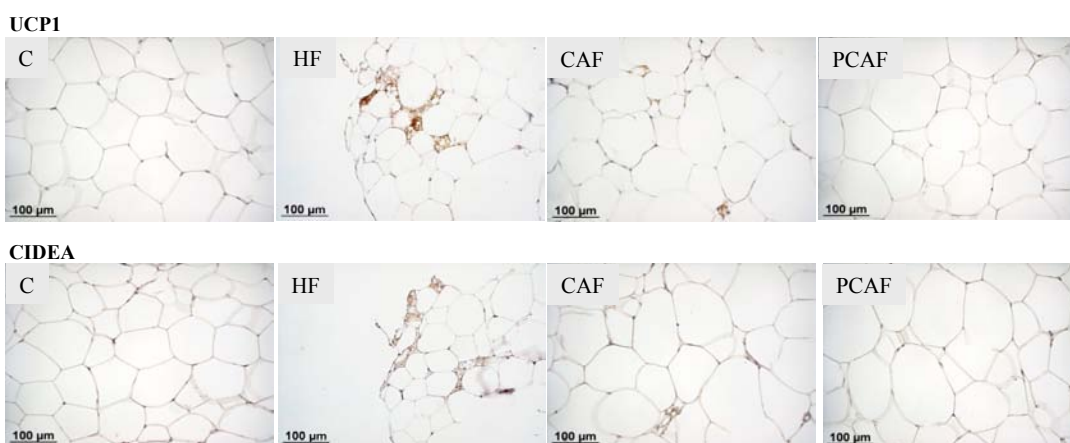


Figure 2. UCP1 and CIDE-A immunostaining in rWAT in the same animals and conditions described in Table 1. A co-location for both proteins is evidenced by serial sections immunostaining. We can observe the appearance of multilocular adipocytes positive for UCP1 and CIDE-A in the HF and CAF groups, while no multilocularity of staining for the studied proteins was evident in the control or PCAF groups.

4.3.- Brown/brite adipocyte markers in PBMC

Our main objective was to analyse if PBMC could be reflecting gene expression changes related to browning capacity observed in adipose tissue in response to the intake of high fat diets. To that purpose we analysed the same markers as those studied in WAT and BAT. We found detectable expression levels in PBMC (in at least 3 out of 6 animals) of the brown markers: *Cidea*, *Ebf3*, *Eva1*, *Fbxo31*, *Fgf21*, *Prdm16* and *Tbx15* (Figure 3); no expression was found for *Pgc1a* or *Ucp1*. Gene expression of *Cidea*, *Ebf3* and *Eva1* was detected only in PBMC of the animals fed high fat diets (not in controls) while *Fgf21* and *Prdm16* gene expression increased as result of the intake of the high fat diets, although statistical significance was not reached due to high interindividual variation (Figure 3). Specially, cafeteria diet feeding induced an increase in mRNA levels of *Prdm16*, which codes for a transcriptional coactivator that plays a pivotal role in brown fat cell differentiation with the ability to up-regulate *Ucp1*, *Cidea* and *Pgc1a* gene expression. For brite markers, detectable expression was found for: *Hoxc9*, *Slc27a1* and *Tmem26*, but not for *Cd137* or *Tbx1*. *Hoxc9* was not affected by dietary treatment. However, as happened in white adipose tissue, both hyperlipidic diets increased expression of *Slc27a1*; a tendency to higher *Tmem26* expression in treated animals was also observed. *Slc27a1* expression in PBMC is especially interesting to be considered as browning marker; it is expressed in considerable levels ($Ct= 27.5\pm 0.2$) and reflects the same regulatory pattern (induction) observed in rWAT in response to the intake of the high fat diets.

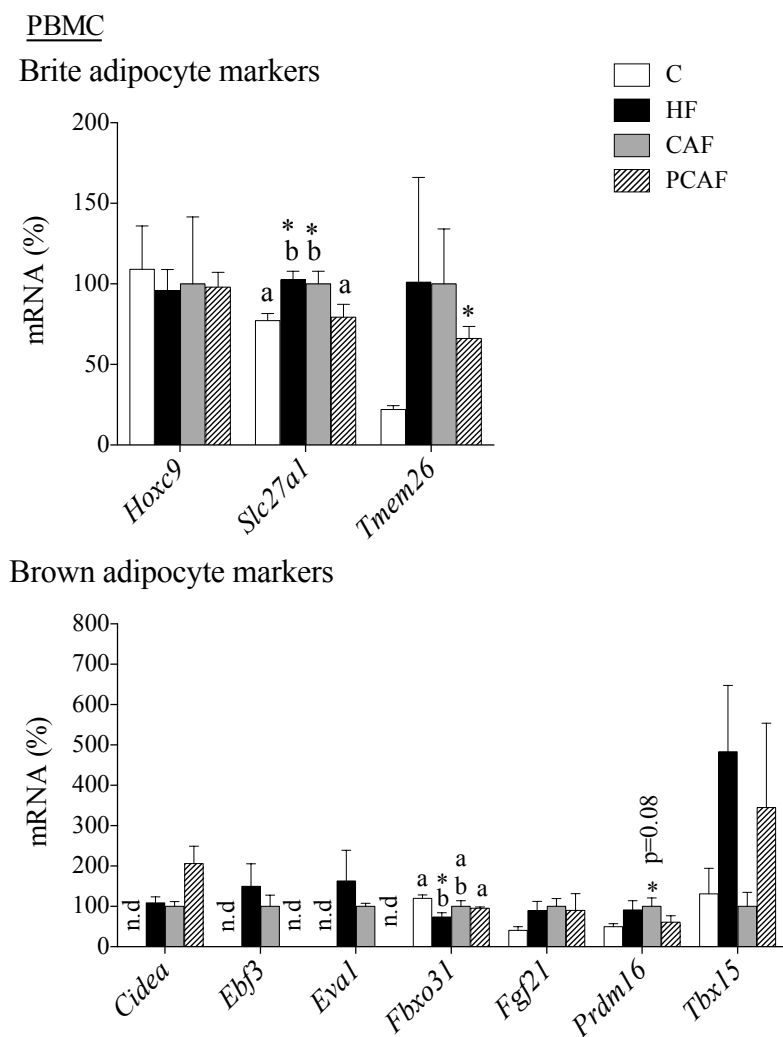


Figure 3. Gene expression of brown and brite markers in PBMC. mRNA levels of brown and brite markers in PBMC analysed in the same animals and conditions described in Table 1. mRNA expression levels were measured by real-time RT-PCR. Results represent mean \pm SEM (= at least 3 out of 6 animals) of ratios of specific mRNA levels referred to *Gdil* (used as reference gene). Data of the cafeteria group was set to 100% and the rest of the values are referred to this. N.d = not detected (Ct values over 35). Bars not sharing a common letter (a, b, c) are significantly different (one-way ANOVA, $p < 0.05$ and LSD post-hoc test). * vs control group (Student's *t* test, $p < 0.05$).

5.- Conclusion

In this study, we have evaluated the usefulness of a subset of easily obtainable blood cells, PBMC, to study BAT activation and WAT browning. We have previously demonstrated that PBMC can reflect nutritional mRNA expression changes of genes involved in lipid metabolism, which occur in adipose tissue (Caimari et al., 2010a; Oliver et al., 2013). Interestingly, in this study we have shown that some key BAT/brite markers are expressed in PBMC and follow the same regulatory behaviour to that observed in adipose tissue of animals fed hyperlipidic diets. These data provide only preliminary evidences and studies analysing the effect on PBMC gene expression in response to more drastic stimuli, such as cold exposure, should be performed to explore the potential use of PBMC to study BAT activation and white to brown adipose tissue remodelling. The possibility of using PBMC to perform browning studies is extremely valuable as it opens the possibility to realize human studies with minimum invasion. However, more studies are needed to understand the relevance on energy expenditure of changes observed mainly at molecular level in the expression of key browning markers and to establish the usefulness of PBMC as a tool to perform studies related to BAT activation and WAT browning.

Manuscrito 6/Manuscript 6

**Gene expression of peripheral blood mononuclear cells is affected by
cold exposure**

Reynés, B.†, García-Ruíz, E.†, Oliver, P., Palou, A.

†Bàrbara Reynés and Estefanía García-Ruiz contributed equally to this work

Title page

Title: Gene expression of peripheral blood mononuclear cells is affected by cold exposure

Authors: Bàrbara Reynés†, Estefanía García-Ruiz†, Paula Oliver*, Andreu Palou

†Bàrbara Reynés and Estefanía García-Ruiz contributed equally to this work.

Affiliation: Laboratory of Molecular Biology, Nutrition and Biotechnology, Universitat de les Illes Balears and CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERObn), Palma de Mallorca, Spain

Address correspondence to: Dr. Paula Oliver, Laboratory of Molecular Biology, Nutrition and Biotechnology, Universitat de les Illes Balears. Cra. Valldemossa Km 7.5. E-07122-Palma de Mallorca, Spain. Phone: +34 971172548. Fax: +34 971173426. E-mail: paula.oliver@uib.es

Run title: Cold-exposure markers in PBMC

Author contribution: Paula Oliver and Andreu Palou conceived the experiment. Bàrbara Reynés and Estefanía García-Ruiz did the major part of the experimental work. Bàrbara Reynés and Paula Oliver wrote the article and Andreu Palou participated in critical revising of the manuscript.

Acknowledgements: We thank Enzo Ceresi by technical assistance in morphological analysis. CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición is an initiative of the ISCIII. This work was supported by the EU FP7 project DIABAT (HEALTH-F2-2011-278373) and by the Spanish Government (Ministerio de Educación y Ciencia, EPIMILK-AGL2012-33692). Laboratory of Molecular Biology, Nutrition and Biotechnology is member of the European Research Network of Excellence NuGO (The European Nutrigenomics Organization, EU Contract: FOOD-CT-2004-506360 NUGO). EGR is recipient of a fellowship from the University of the Balearic Islands.

Conflict of interest: None

1.- Abstract

Due to the discovery of brown adipose tissue (BAT) in humans, there is increased interest in the study of the induction of this thermogenic tissue as a therapy to combat obesity and related complications. Cold exposure is one of the strongest stimuli able to activate BAT and to induce the appearance of brown-like adipocytes, brite adipocytes, in white fat depots (browning). We have analysed the potential of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) to reflect BAT and retroperitoneal white adipose tissue (rWAT) response to one-week cold acclimation (4°C) at different ages of rat development (1, 2, 4 and 6 months). As expected, cold exposure increased lipolytic capacity in BAT and rWAT, which was reflected in PBMC (increased *Cpt1a* expression), and related to an increase in circulating NEFA and decreased adiposity. Cold exposure increased the expression of the key thermogenic gene, *Ucp1*, both in BAT and rWAT, only in one-month-old animals. Additionally, in BAT, other brown/brite markers were affected by cold exposure during the whole developmental period studied. However, in rWAT, cold exposure increased the studied markers mainly at early age. PBMC did not express *Ucp1*, but expressed other brown/brite markers, which resulted regulated by cold exposure. Of particular interest, PBMC reflected browning induction occurring in rWAT of young animals (one month) characterised by increased *Cidea* expression and by the appearance of a high number of multilocular CIDE-A positive adipocytes. These results provide evidences pointing out to PBMC as an easily obtainable biological material to be considered to perform browning studies with minimum invasiveness.

2.- Introduction

PBMC constitute an easily obtainable fraction of blood cells consisting basically in lymphocytes and monocytes. These cells travel around the body and can respond to internal or external signals expressing a wide number of genes, including tissue-specific transcripts, reflecting whole metabolic status (Liew et al., 2006). PBMC are increasingly being used for clinical diagnostic purposes as they can reflect gene expression patterns of different pathologies (Baine et al., 2011; Chang et al., 2013; Todorova et al., 2012). Moreover, PBMC have been shown useful for nutritional studies as they can reflect the effects of specific diets and feeding conditions (fasting/re-feeding) on gene expression, which occur in key energy homeostatic tissues, as adipose tissue (Caimari et al., 2010a; Caimari et al., 2010b, d; de Mello et al., 2012; Gray et al., 2012; Oliver et al., 2013; Satoh-Asahara et al., 2012; Sánchez et al., 2012; Zhao et al., 2012). In addition, PBMC have been proposed as a potential source of obesity biomarkers (Konieczna et al., 2014; Oliver et al., 2013).

Mammals are provided with two different types of adipose tissue: white (WAT) and brown (BAT) (Cinti, 2005). WAT is mainly composed by white adipocytes, which store as fat the excess of energy in a large lipid droplet (unilocular adipocytes). On the contrary, BAT is made up of multilocular adipocytes, which are specialized in burning fat to produce heat in a process known as facultative thermogenesis in response to stimulus as cold exposure or the intake of hypercaloric diets in a process mediated by beta-adrenergic receptors (Cinti, 2005; Ishibashi and Seale, 2010; Palou et al., 1998). BAT thermogenic activity is due to the presence of the mitochondrial uncoupling protein 1 (UCP1), and represents an important part of energy expenditure, critical in overall energy balance (Cannon and Nedergaard, 2004; Feldmann et al., 2009; Palou et al., 1998). The main thermogenic stimulus is cold exposure: stimulation of the sympathetic nervous system by cold or administration of beta-adrenergic agonists induce fatty acid oxidation in adipose tissue and thermogenesis in BAT by increasing BAT size, mitochondriogenesis, as well as UCP1 expression or protein activity to maintain body temperature (Cannon and Nedergaard, 2004; Cinti et al., 2002; Fuster et al., 2009; Palou et al., 1998; Rodríguez and Palou, 2004; Saito, 2013). Moreover, cold exposure and beta-adrenergic stimulation induce a process known as browning, which consists in the appearance of brown-like adipocytes in typical WAT depots (Barbatelli et al., 2010; Cinti, 2005; Cousin et al., 1992; Distel et al., 2012; Frontini et al., 2013; Fuster et al., 2009; Lee et al., 2012; Xue et al., 2005). These adipocytes have been named *brite* (from brown-in-white) or *beige* adipocytes, display a peculiar gene expression pattern and share some characteristics with classical brown adipocytes, as expression of UCP1 mRNA (Barbatelli et al., 2010; Bonet et al., 2013; Lasar et al., 2013; Seale et al., 2011; Sharp et al., 2012; Waldén et al., 2012; Wu et al., 2012; Wu et al., 2013). In rodents it is known that BAT and browning induction can increase energy expenditure and help to maintain body weight (Bonet et al., 2013; Kopecký et al., 1996; Xue et al., 2005). Interest in BAT has reemerged since the discovery of important amounts of inducible tissue in adult humans (Nedergaard et al., 2007). As occurs in rodents, cold exposure activates human BAT depots and this could be important in the control of body temperature and adiposity (Saito et al., 2009). Interestingly, based on gene expression signatures, it has been reported that BAT depots in human are composed by *brite* cells (Wu et al., 2012) so that BAT activation could be in reality representing browning induction. Thus, increased thermogenesis (BAT and browning induction) appears as an interesting strategy for obesity treatment in rodents and also in humans.

BAT studies in humans require invasive techniques as biopsies of adipose tissue or the use of techniques as positron emission tomography, which implies the use of radioactive isotopes. Thus, it would be of interest to dispose of a readily available source of biomarkers useful to perform BAT studies. We have previously reported, in rodents, that PBMC are able to express different brown/brite adipocyte markers and can reflect the induction of some browning markers in adipose tissue in response to the intake of hyperlipidic diets (García-Ruiz et al.). Here we aim to establish the usefulness of PBMC as a tool to perform studies related to BAT activation and WAT browning by analysing the expression of key brown/brite adipocyte markers in response to the main thermogenic stimulus, to cold acclimation (one week at 4°C), at different ages of rat development (from one to 6 months), as BAT thermogenic activity is known to be highly affected by age (Cannon and Nedergaard, 2004; Lecoultre and Ravussin, 2011; McDonald and Horwitz, 1999; Yamashita et al., 1994). The possibility of using PBMC for BAT studies would be very valuable mainly thinking in future application to human studies.

3.- Materials and methods

3.1.- Animals and experimental design

All animal experimental procedures were reviewed and approved by the Bioethical Committee of our university, and guidelines for the use and care of laboratory animals of the university were followed.

Female Wistar Rats (Charles River Laboratories España, SA, Barcelona, Spain) of different ages (1, 2, 4 and 6 months) were used. Rats of different ages were distributed into two groups (n=5-6): a control group, acclimatized to room temperature ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), which is considered the equivalent temperature to mimic human physiology (Speakman and Keijer, 2012), and a cold group, acclimatized to 4°C for 1 week. Animals were housed individually with a 12:12 h light/dark cycle and had free access to standard chow diet (Panlab, Barcelona, Spain), and were weighed before and after cold exposure.

After the experimental period, the animals were sacrificed by decapitation and different WAT depots (inguinal, retroperitoneal, epididymal and mesenteric), as well as the interscapular BAT were rapidly removed and weighed to determine the adiposity index, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until RNA analysis (analysis were performed in BAT and retroperitoneal WAT). Blood sample from neck (approximately 500 μl) was stored at room temperature for 1 h and was centrifuged at 1000 g for 10 min at 4°C to collect serum.

3.2.- Isolation of peripheral blood mononuclear cells

Trunk blood samples of control and cold exposed rats (since 1 to 6 month age) were used to isolate PBMC, with EDTA 0.5 M as anticoagulant. After blood collection, PBMC were isolated by OptiPrep gradient separation, according to the instructions indicated by manufacturer (Sigma-Aldrich Química, SL, Madrid, Spain), with some modifications. Briefly, anticoagulant-treated blood was filled up to 6 ml with solution C (146 mM NaCl and 1 mM HEPES). Afterwards, blood was layered carefully to form a density barrier, by mixing 2.7 ml of OptiPrep with 9.3 ml of OptiPrep diluent (Solution C diluted 1/1.2 in water), without intermixing (3 ml of density barrier for 2 ml of blood mixed with solution C) in a centrifuge tub. Then, the tub was centrifuged at 700 g for 20 min at 20°C in a swinging-bucket rotor with acceleration and deceleration adjusted at zero. PBMC, together with platelets, were harvested from the interface between plasma layer and OptiPrep. This material was then centrifuged in solution C at 400 g for 10 min at 20°C to wash PBMC and to remove the platelets.

3.3.- Adiposity index

Adiposity was determined by an adiposity index computed for each rat as the sum of the mass of all the white adipose tissue depots (inguinal, retroperitoneal, epididymal and mesenteric) expressed as a percentage of total body weight.

3.4.- Measurement of circulating glucose and non-esterified free fatty acid

Blood glucose concentration was measured using an Accu-Chek Glucometer (Roche Diagnostics, Barcelona, Spain) in blood obtained from the neck at the moment of sacrifice. Non-esterified free fatty acids (NEFA) levels were measured in serum using an enzymatic colorimetric NEFA-HR2 kit (from WAKO, Neuss, Germany).

3.5.- Total RNA isolation

Total RNA from PBMC samples was extracted using Tripure Reagent (Roche Diagnostics Barcelona, Spain) and then were purified with a Quiagen RNeasy Mini Kit spin columns (Izasa, Barcelona, Spain). Total RNA from retroperitoneal white adipose tissue and from brown adipose tissue was extracted using TriPure reagent (Roche Diagnostics Barcelona, Spain) and was then purified using E.Z.N.A. Total RNA Kit I (Omega Bio-Tek, Vermont, USA); isolated RNA from adipose tissues was purified by precipitation with 3 M sodium acetate and absolute ethanol. RNA yield was quantified on a NanoDrop ND 1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) and its integrity was confirmed using agarose gel electrophoresis.

3.6.- Real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis

Expression of genes of interest (browning markers and lipid metabolism genes) was determined by real-time RT-PCR in PBMC, in the retroperitoneal WAT (rWAT) selected as representative white adipose depot and in interscapular BAT. Fifty ng of total RNA from PBMC was reverse transcribed to cDNA using iScript cDNA synthesis kit (BIO-RAD, Madrid, Spain) at 25°C for 5 min, 42°C for 30 min and 85°C for 5 min in an Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Madrid, Spain). Otherwise, 250 ng of total RNA from adipose tissues was denatured at 60°C for 10 min and then reverse transcribed to cDNA using MuLV reverse transcriptase (Applied Biosystems) at 20°C for 15 min, 42°C for 30 min and a final step of 5 min at 95°C (according to Applied Biosystem's procedure) in an Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler. Each PCR was performed from diluted (1/5 for PBMC and 1/10 for adipose tissues) cDNA template, forward and reverse primers (5 µM), and Power SYBER Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) in a total volume of 11µl, with the following profile: 10 min at 95°C, followed by a total of 40 temperature cycles (15s at 95°C and 1 min at 60°C) with a final cycle of 15s at 95°C, 1 min at 60°C and 15s at 95°C. In order to verify the purity of the products, a melting curve was produced after each run according to the manufacture's instructions. The threshold cycle (Ct) was calculated using the instrument's software (StepOne Software v2.0, from Applied Biosystems) and the relative expression of each mRNA was calculated as a percentage of controls rats, using the Pfaffl's method (Pfaffl, 2001). *Lrp10* was chosen as housekeeping gene because it has been demonstrated as a suitable reference gene for studies using adipose tissue and cold exposure (Caimari et al., 2012; Gabriellsson et al., 2005). Primers for the different genes are described in Table 1 and were obtained from Sigma Genosys (Sigma Aldrich Química SA, Madrid, Spain).

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Amplicon size (bp)
<i>Adrb3</i>	CCTTCAACCCGCTCATCTAC	TGGGAAATGGACGCTCAC	189
<i>Cidea</i>	TCAGACCCTAAGAGACAACACA	CATTGAGACAGCCGAGGA	164
<i>Cpt1a</i>	GCTCGCACATTACAAGGACAT	TGGACACCACATAGAGGCAG	250
<i>Fasn</i>	CGGCGAGTCTATGCCACTAT	ACACAGGGACCGAGTAAT	222
<i>Fgf21</i>	ACAGATGACGACCAGGACAC	AGGCTTTGACACCCAGGATT	145
<i>Hoxc9</i>	CGGCAGCAAGCACAAAGA	AGAAACTCCTTCTCCAGTTCCA	138
<i>Pgcla</i>	CATTTGATGCACTGACAGATGGA	CCGTCAGGCATGGAGGAA	70
<i>Prdm16</i>	ACGACCACCTCTGCTACCTC	GGGCTCCTATTTTTGACCTTCT	216
<i>Slc27a1</i>	CAGGAGTGGAGGGGAAAG	CAGAAGACGCAGGAAGATGG	131
<i>Tmem26</i>	GCTGTTCCTGTTGCATTCCC	GGAGAAAGCCATTTGTAGCCTC	159
<i>Ucp1</i>	GGGCTGATTCCTTTTGGTCT	GGTGGTGATGGTCCCTAAGA	229
<i>Lrp10</i> (reference gene)	TCCCCTTCTTCTCCTCCTC	TTACCGTCTGTTCCTTGCTG	198

Table 1. Nucleotide sequences of primers and amplicon size used for real-time RT-PCR amplification. *Adrb3*: beta-3 adrenergic receptor; *Cidea*: cell death-inducing DNA fragmentation factor- α -like effector A; *Cpt1a*: carnitine palmitoyl transferase 1a; *Fasn*: fatty acid synthase; *Fgf21*: fibroblast growth factor 21; *Hoxc9*: homeo box C9; *Pgcla*: peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 alpha; *Prdm16*: PR domain containing protein-16; *Slc27a1*: solute carrier family 27 (FATP1 fatty acid transporter), member 1; *Tmem26*: transmembrane protein 26; *Ucp1*: uncoupling protein 1; and *Lrp10*: low-density lipoprotein receptor-related protein 10.

3.7.- Immunohistochemistry analysis of CIDE-A and UCP1 in retroperitoneal white adipose tissue

Retroperitoneal WAT samples were fixed by immersion in 4% paraformaldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.4, overnight at 4°C, washed in phosphate buffer, dehydrated in a graded series of ethanol, cleared in xylene and embedded in paraffin blocks. Five-micrometers serial sections of adipose tissue of the different experimental groups were immunostained by means of the avidin-biotin technique (Hsu et al., 1981). Briefly, serial sections were incubated with normal goat serum 2% in PBS pH 7.3 to block unspecific sites and then overnight at 4°C with primary rabbit polyclonal UCP1 antibody (GeneTex International Corporation, CA, USA) diluted 1:200 in PBS and with CIDE-A primary rabbit polyclonal antibody (Sigma, St. Lois, MO, USA) diluted 1:150 in PBS. Sections were then incubated with the corresponding biotinylated anti-rabbit IgG secondary antibody (Vector Laboratories, Burlingame, CA), diluted 1:200, and finally with ABC complex (Vectastain ABC kit, Vector, CA, USA). Peroxidase activity was revealed with Sigma Fast 3,3'-diaminobenzidine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) as substrate. Finally, sections were counterstained with hematoxylin and mounted in Eukitt (Kindler, Germany). Images were acquired with a Zeiss Axioskop 2 microscope equipped with AxioCam ICc3 digital camera and AxioVision 40V 4.6.3.0 Software (Carl Zeiss, S.A., Barcelona, Spain).

3.8.- Statistical analysis

All data are expressed as the mean \pm SEM. Differences between ages were analysed using ANOVA and least significant difference (LSD) post-hoc comparisons. The effect of cold exposure was analysed using Student's *t*-test. The analyses were performed with SPSS for windows (SPSS, Chicago, IL, USA). Threshold of significance was defined at $p < 0.05$, and is indicated when different.

4.- Results

4.1.- Body weight, adiposity and circulating glucose and NEFA

As seen in Table 2, exposure to 4°C during one week produced decreased adiposity in animals of the different ages studied (1, 2, 4 and 6 months) in comparison to controls; the lower adiposity index was due to a generalized decrease in the size of the different WAT depots (inguinal, retroperitoneal, epididymal and mesenteric). Decreased adiposity was translated into a significant lower body weight only in one- and 4-month-old animals. On the other hand, cold exposure produced an important increase in the size of BAT (around 77% increase), which was evident in animals until 4 months of age. NEFA circulating levels were increased in cold-exposed animals from the age of 2 months. However, circulating levels of glucose, were not affected with cold exposure in any age (data not shown).

4.2.- Effect of cold exposure on expression of genes involved in fatty acid mobilization in BAT, retroperitoneal WAT and PBMC

As a general trend, both in BAT and in rWAT, cold exposure induced an increase in the expression of *Cpt1a*, a gene involved in fatty acid oxidation and a decrease in the expression of the key fatty acid synthesis gene *Fasn*; moreover, mRNA levels of *Adrb3* gene coding for the beta-3 adrenergic receptor was decreased in adipose tissue of cold-exposed animals, an effect which was evident mainly in BAT (Figure 1) suggesting a retroregulation due to chronic cold stimulation as occurs with a choric treatment with noradrenaline (Roca et al., 1999). An influence of age on gene expression was observed for *Cpt1*: in rWAT, increased *Cpt1* expression was only observed in older rats, of 4 and 6 months, while in BAT, *Cpt1* expression increased at the different ages except in the oldest rats of 6 months. In PBMC, we also observed an increase on *Cpt1a* mRNA levels, precisely at the age of 4 and 6 months, as in rWAT, while no effect was observed for *Fasn* expression in PBMC of cold-exposed animals (Figure 1); *Adrb3* expression was not detectable in PBMC.

2

	Body weight (g)		Adiposity index (%)	BAT (g)	iWAT (g)	rWAT (g)	eWAT (g)	mWAT (g)	NEFA (mM)	
	Initial	Final								
1 month	Control	45.1±1.6	86.2±2.2	1.87±0.06	0.222±0.015	0.944±0.067	0.149±0.005	0.239±0.014	0.284±0.027	5.32±0.52
	Cold	44.2±1.6	72.8±2.3*	1.14±0.08*	0.347±0.007*	0.466±0.055*	0.093±0.002*	0.098±0.016*	0.193±0.038* (p=0.07)	6.98±1.76
2 month	Control	180±4	199±5	4.42±0.32	0.322±0.044	2.40±0.15	1.85±0.21	3.54±0.46	1.04±0.03	4.82±0.44
	Cold	183±4	196±5	2.91±0.30*	0.575±0.025*	2.06±0.16	1.20±0.23*	1.87±0.29*	0.605±0.071*	9.30±1.47*
4 month	Control	267±8	273±6	5.89±0.18	0.385±0.019	3.24±0.25	3.36±0.11	7.48±0.35	2.03±0.26	4.45±0.15
	Cold	254±7	244±7*	4.68±0.46*	0.723±0.097*	2.50±0.34	2.52±0.24*	5.30±0.62*	1.12±0.08*	8.52±0.77*
6 month	Control	282±8	281±6	7.44±0.24	0.568±0.048	4.76±0.34	4.55±0.50	7.39±0.34	3.72±0.18	5.66±0.71
	Cold	281±6	267±6	5.42±0.43*	0.579±0.042	3.44±0.26*	3.07±0.30*	5.89±0.50*	2.10±0.33*	9.37±1.25*

Table 2. Body weight before and after cold exposure (g), adiposity index (%), size of the adipose tissues depots and circulating NEFA levels (mM) in control and cold-exposed rats. The adiposity index was computed as the sum of inguinal, retroperitoneal, epididymal and mesenteric white adipose tissue depots weights and expressed as a percentage of total body weight. Tissue weights of brown adipose tissue (BAT) and different white adipose tissue (WAT) depots, inguinal (iWAT), retroperitoneal (rWAT), mesenteric (mWAT) and epididymal (eWAT) are given. Results represent means ± SEM (n= 5-6). * effect of cold exposure (cold-exposed rats vs their respective controls; Student's t-test, p<0.05 or indicated when different).

2

2

222

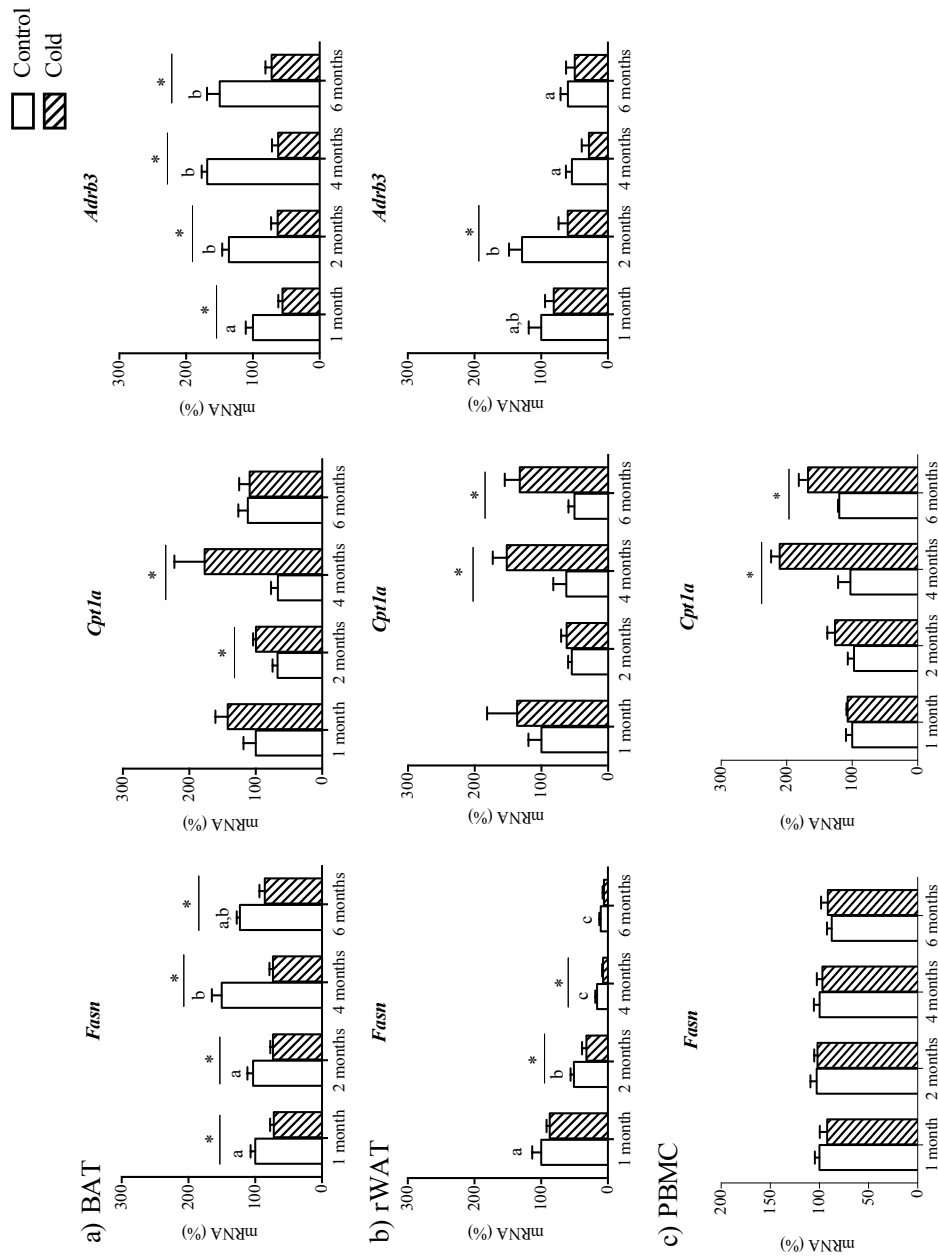


Figure 1. Gene expression of genes involved in lipid metabolism and of beta-3 adrenergic receptor gene (*Fasn*, *Cpt1a* and *Adrb3*) measured by real-time RT-PCR, in BAT, rWAT and PBMC of rats at different ages (from 1 to 6 months) acclimatized to different room temperatures: 22°C (control) or 4°C for one week (cold). Results represent mean \pm SEM (n=5-6) of ratios of specific mRNA levels relative to *Lrp10*, expressed as a percentage of the value of fed animals in the control group that was set to 100%. Bars not sharing common letter (a, b, c) are significantly different (one-way ANOVA, $p < 0.05$). DMS post-hoc was used after the ANOVA analysis. * effect of cold exposure (cold-exposed rats vs their respective controls; Student's t-test, $p < 0.05$ or indicated when different).

4.3.- Effect of cold exposure on the expression of browning markers in BAT and retroperitoneal WAT

Cold exposure affected gene expression of selected brown/brite markers in a depot-specific manner in BAT and rWAT at different ages of rat development (Figures 2 and 3). In BAT, cold exposure increased the expression of the key thermogenic gene *Ucp1* at the age of one month, but no change was observed thereafter in older rats. The expression of other genes highly expressed in BAT, *Fgf21* and *Pgc1α*, also increased in BAT of cold-exposed animals at different ages. In addition, cold exposure increased the expression of the brite marker *Slc27a1* in all the ages studied. On the contrary, *Cidea* expression, a well-known brown adipocyte marker, decreased its expression in response to cold exposure in animal of all the ages studied. The same happened for *Prdm16*, related to brown adipose adipocyte differentiation, whose expression decreased in BAT of 4- and 6-month-old animals. Our results also showed an increase in basal gene expression of *Cidea*, *Prdm16* and *Slc27a1* during rat growth.

As happened in BAT, cold exposure produced increased *Ucp1* expression in rWAT in one-month-old animals (Figure 3). The same expression pattern was observed for other brown adipocyte markers, *Cidea*, *Pgc1α* and *Prdm16*, whose expression increased in cold-exposed animals the first month of life, while surprisingly, expression of *Fgf21* decreased in these animals. We also observed increased expression of the brite marker *Slc27a1* in response to cold, but in this case the increase was observed in adult animals of 4 and 6 months of age. An effect of age was observed in basal expression of *Slc27a1*, which decreased during rat development. The expression of other brite marker, *Hoxc9* (which was non detectable in BAT), was not affected by cold exposure at any of the ages.

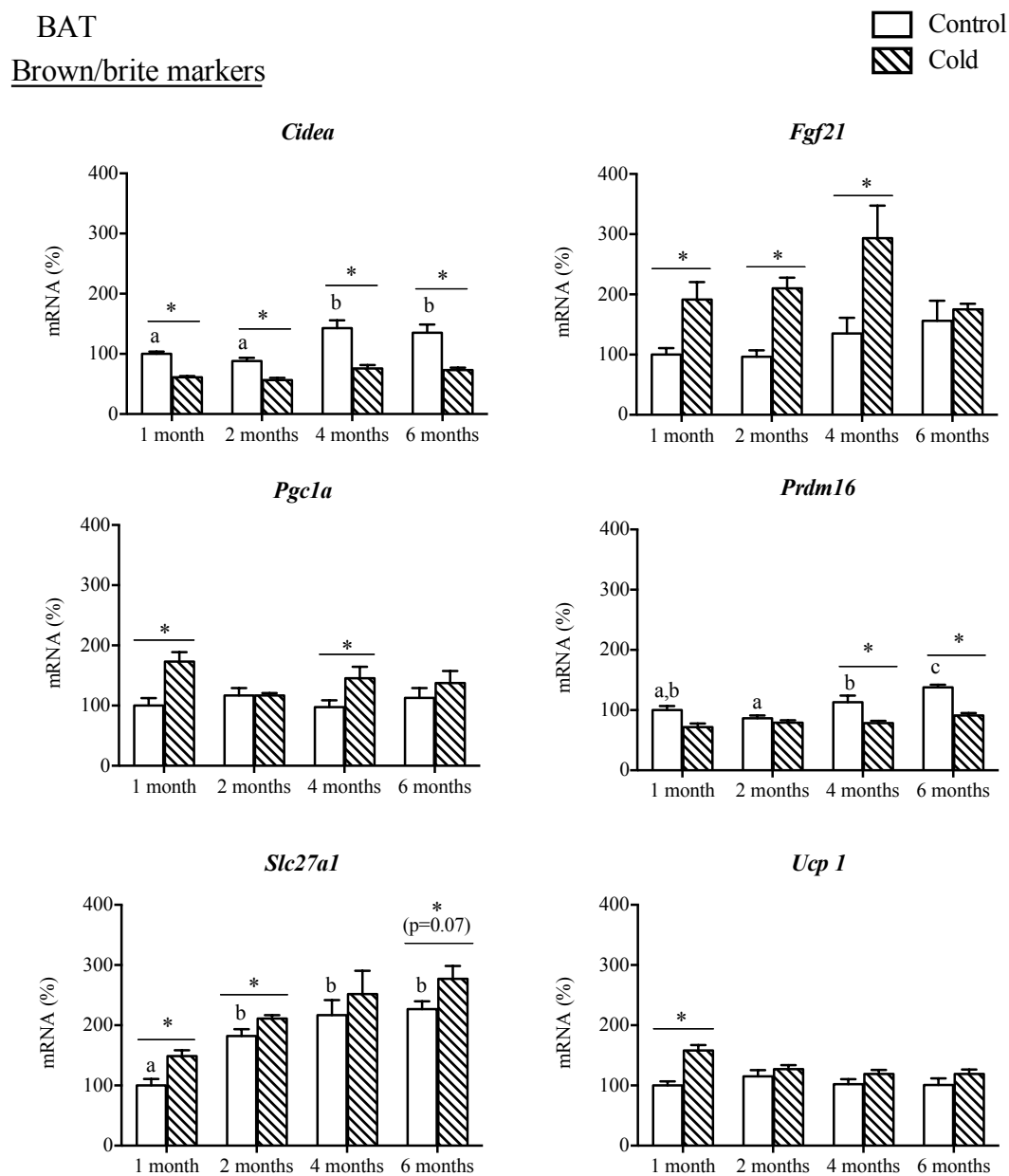


Figure 2. Gene expression of brown/brite markers (*Cidea*, *Fgf21*, *Pgc1a*, *Prdm16*, *Slc27a1* and *Ucp1*) measured in interscapular brown adipose tissue in the same animals described in Figure 1.

rWAT

Brown/brite markers

□ Control
▨ Cold

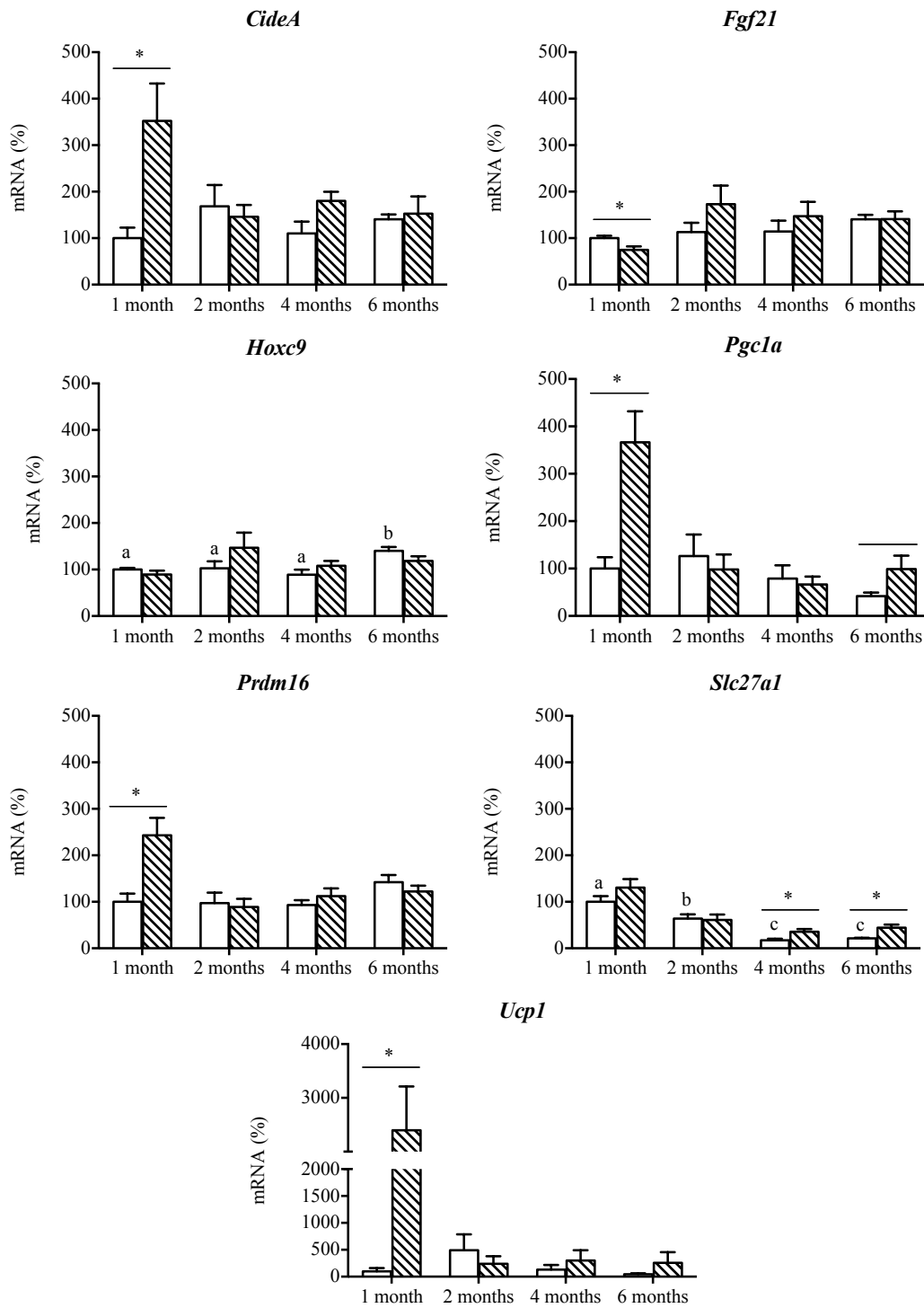


Figure 3. Gene expression of brown/brite markers (*Cidea*, *Fgf21*, *Hoxc9*, *Pgc1a*, *Prdm16*, *Slc27a1* and *Ucp1*) measured in the retroperitoneal white adipose tissue (rWAT) in the same animals described in Figure 1.

4.4.- Effect of cold exposure on the expression of browning markers in PBMC

Although we did not detect *Ucp1* or *Pgc1a* gene expression in PBMC, interestingly, these cells expressed other brown adipocyte markers; *Cidea*, *Fgf21* and *Prdm16*, as well as the brite markers *Hoxc9* and *Slc27a1* (Figure 4). Expression of these genes was increased by cold exposure in an age-dependent manner. *Cidea* ($p=0.08$, due to interindividual variation), *Fgf21*, *Prdm16* ($p=0.12$) and *Slc27a1* mRNA levels increased in one-month-old animals, while *Hoxc9* expression was increased in older animals, from the age of 4 months. *Slc27a1* expression was also increased in 6-month-old animals.

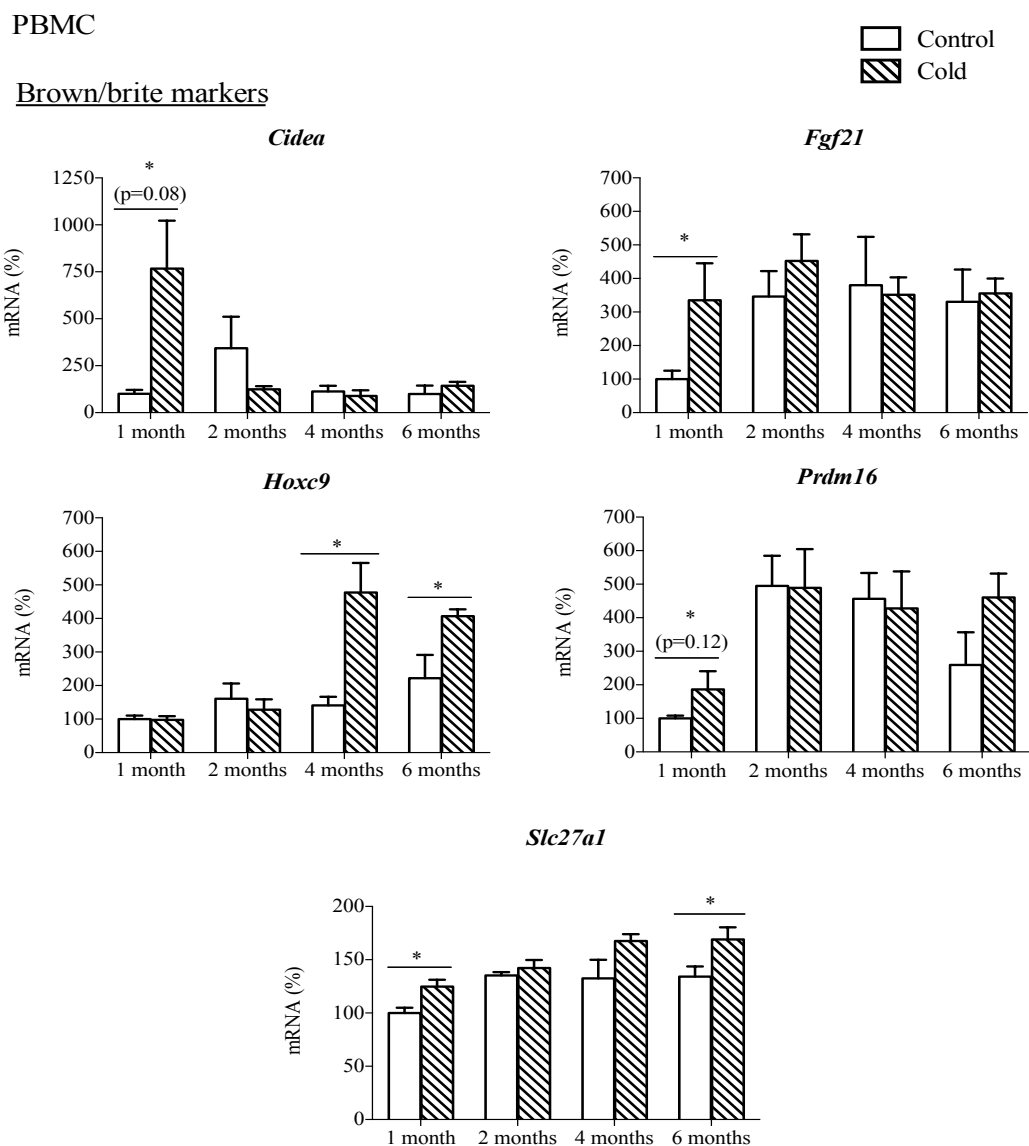


Figure 4. Gene expression of brown/brite markers (*Cidea*, *Fgf21*, *Hoxc9*, *Prdm16* and *Slc27a1*) measured in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in the same animals described in Figure 1.

?

4.5.- Effect of cold exposure on immunohistochemistry analysis in retroperitoneal WAT

Gene expression changes observed at molecular level in rWAT suggested that brown adipocytes could have emerged in response to cold, particularly in the youngest animals (one month of age). To confirm browning induction we performed a morphological and immunohistochemical analysis in this adipose depot. At the age of one month, we could observe a strong transformation of the rWAT with the appearance of a high number of UCP1 and CIDE-A positive multilocular adipocytes in cold-exposed animals (Figure 5). This remodelling from white to brown adipose tissue was also observed, although to a lesser extent, in some of the 2-month-old rats. At the age of 4 months only a small browning effect was observed, while no multilocularity was evident in the oldest animals studied (6 months). Of note, in young animals (up to the age of 2 months) we could observe positive CIDE-A staining in unilocular white adipocytes, which were negative for UCP1.

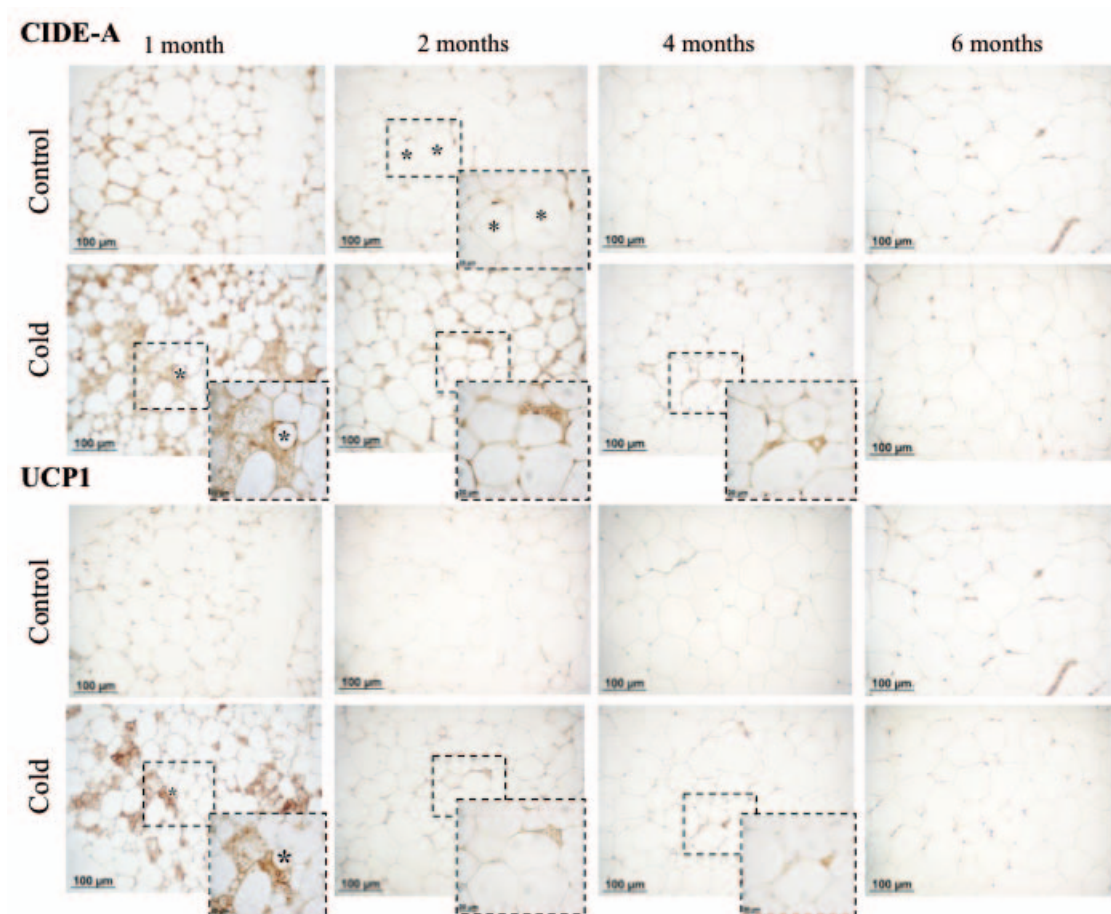


Figure 5. UCP1 and CIDE-A immunostaining in retroperitoneal WAT of the same animals described in Figure 1. We can observe a strong browning induction in one-month-old cold-exposed animals, characterized by the appearance of multilocular brite adipocytes positive for CIDE-A and UCP1. A weaker browning induction is observed in 2-month-old animals. Some CIDE-A and UCP1 positive cells were also observed at 4 months of age. No evidence of browning in response to cold exposure is observed in animals of 4 or 6 months. The asterisks in one and 2-month-old animals indicate unilocular white adipocytes positive for CIDE-A and negative for UCP1 staining.

5.- Discussion

The interest in BAT-focused therapies to combat obesity and related complications has re-emerged since the discovery of inducible brown adipose tissue in humans (Nedergaard et al., 2007; Roman et al., 2014). However, BAT studies require of invasive techniques, thus, it would be convenient to dispose of an easily obtainable biological material suitable to develop this research. Here we have analysed the capacity to activate BAT and to induce remodelling of white into brown adipose tissue after cold exposure at different ages of rat development by analysing classical as well as newly described brown/brite markers. Moreover, we have demonstrated that gene expression of a subset of blood cells, PBMC, can reflect certain features of adipose tissue cold response.

It is well known that beta-adrenergic stimulation, such as cold exposure, induces an increase of fatty acid catabolism, especially in WAT, while decreases fatty acid synthesis (Caimari et al., 2012; Jankovic et al., 2013). According to this, we observed increased expression of a key gene involved in fatty acid beta-oxidation, *Cpt1a*, and decreased expression of the fatty acid synthesis gene *Fasn* observed both in BAT and rWAT. As result of these adaptations, we can observe increased circulating NEFA levels and decreased adiposity in our cold-exposed animals. We have previously described that PBMC can reflect lipid metabolism gene expression which occur in adipose tissue in response to different stimulus, such as feeding/fasting conditions (Caimari et al., 2010a). Here we show how PBMC also reflected increased *Cpt1a* expression in response to cold exposure, which occurs in adipose tissue.

In parallel with fatty acid mobilization, cold exposure activates BAT thermogenesis (Inokuma et al., 2005). Circulating NEFA are used as fuel to support thermogenesis mediated by UCP1 and moreover, beta-adrenergic stimulation produce increased UCP1 levels and BAT recruitment (Palou et al., 1998). It is known that BAT thermogenesis decreases with age (McDonald and Horwitz, 1999). Our results show increased BAT size in cold-exposed animals at different ages, however, increased *Ucp1* expression was only observed in one-month-old animals, when BAT tissue is more active, coincident with increased expression of *Pgc1a* coding for a transcriptional coactivator of necessary for *Ucp1* expression (Barbera et al., 2001). *Fgf21* codes for a hormone involved in *Pgc1a* and *Ucp1* expression and thus, has an important role in adaptive thermogenesis (Fisher et al., 2012; Lasar et al., 2013; Lee et al., 2013b). Accordingly, as expected (Hondares et al., 2011), BAT *Fgf21* mRNA levels were increased as a response to cold acclimation, except in the oldest animals. We also analysed mRNA expression of other brown adipocyte markers, such as *Cidea*, which codes for a multifunctional protein that is highly expressed in BAT mitochondria (Barneda et al., 2013; Wu et al., 2012). As described Shimizu *et al.* (Shimizu and Yokotani, 2009), large cold exposure induced a down regulation of *Cidea* gene expression. In addition, our data show that *Cidea* decreased expression can be observed at different ages during rat development and, thus, it constitutes a good marker of cold-activated BAT, with independence of age. Surprisingly, the expression of *Prdm16*, which codes for a transcriptional regulator involved in brown adipose development (Frontini et al., 2013; Seale et al., 2011), decreased in 4- and 6-month-old animals. Finally, we analysed BAT expression of *Slc27a1*, which codes for fatty acid transport protein 1, and considered a brite marker (Wu et al., 2012). As expected, *Slc27a1* expression increased in response to cold exposure (Hondares et al., 2011), and this increased expression was maintained at the different ages studied.

In addition to BAT activation, cold exposure induces the appearance of brown-like adipocytes (brite cells), with thermogenic activity in WAT depots (Barbatelli et al., 2010; Bonet et al., 2013; Sharp et al., 2012; Wu et al., 2012). This process, known as browning, can contribute to energy dissipation in WAT (Feldmann et al., 2009; Kopecky et al., 1995; Kopecký et al., 1996). Little is known about the effect of age on WAT browning capacity. Our results show that browning induction in response to cold, analysed in rWAT, was evident during the first month of life. In fact, cold exposure induced a great up regulation of *Ucp1* gene expression only in one-month-old animals, which was related to increased expression levels of other brown markers: *Cidea*, *Pgc1a* and *Prdm16*; gene expression of these markers was not affected in older animals. Accordingly, morphological analysis evidenced cold-induced browning in rWAT at the age of one month. Interestingly, CIDE-A which has been described to be expressed exclusively by multilocular adipocytes, was evidenced by immunohistochemistry in unilocular white adipocytes of young animals up to the age of one month, those with a higher browning capacity. Thus, the presence of this protein in white adipocytes at early ages could be related to an increased propensity for browning. mRNA expression of the brite marker *Slc27a1* also increased in cold-exposed animals, but only in 4- and 6-month animals, while the expression of another brite marker, *Hoxc9* was not affected at any age, coincident with what has been previously described in adult mice after chronic cold exposure (Waldén et al., 2012).

PBMC are able to express approximately 80% of the genome, including tissue-specific transcripts (Liew et al., 2006). Although, these cells did not express the key BAT thermogenic gene *Ucp1* either in control or cold-exposed animals; they were able to express other brown/brite markers such as *Cidea*, *Fgf21*, *Hoxc9*, *Prdm16* and *Slc27a1*. We have previously described that the PBMC can reflect browning induction which occurs in adult Wistar rats due to the intake of hiperlypidic diets (García-Ruiz et al.). However, to our knowledge there are no previous reports on the study of the effects of cold exposure on PBMC gene expression. Data presented here demonstrate that these cells can reflect some of the cold response changes in gene expression, which occur in adipose tissue, mainly in WAT, specially at early stages of life. The most relevant data was the important increase in *Cidea* mRNA expression observed in cold-exposed rats at the age of one month, which is coincident to what observed in rWAT. At that age we also observed increased *Fgf21*, *Prdm16* and *Slc27a1* expression in response to cold exposure. Apart from gene expression changes observed in the youngest animals studied, cold exposure induced a marked increase in mRNA expression of the brite marker *Hoxc9* expression in PBMC of animals at the age of 4 and 6 months, which was not observed in rWAT and seems not related to increased browning capacity.

Taken together, this work, which includes the analysis of recently described BAT/brite markers, demonstrates that cold exposure induced gene expression changes related to BAT activation and WAT browning mainly at early age (one month). However, in BAT, some of the analysed markers were affected by cold exposure during the whole developmental period studied. Besides, our results manifested that PBMC not only expressed the brown/brite markers, but also were able to response to cold exposure reflecting some of the features observed in adipose tissue, particularly rWAT browning. More studies are needed, preferably with humans, to identify new markers of cold response in blood cells, to further explore the potential use of PBMC to perform BAT studies.

Capítulo V.- RECAPITULACIÓN

V.- RECAPITULACIÓN

Los resultados que se presentan en esta tesis doctoral, recogidos en 6 manuscritos originales, definen a las PBMC como un material biológico útil para la obtención de biomarcadores con aplicabilidad en estudios de obesidad. Estas células permiten identificar desregulaciones metabólicas tempranas asociadas al incremento de peso así como también la recuperación metabólica asociada a la pérdida de peso. Además, constituyen un material de interés para el estudio de nuevas estrategias/terapias antiobesidad, como las encaminadas a incrementar el gasto energético mediante la activación del TAM. Por tanto, este proyecto de tesis abre nuevas posibilidades terapéuticas para la prevención y/o tratamiento de la obesidad y sus complicaciones.

1.- Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) como material biológico para el estudio de la desregulación de la homeostasis energética asociada al desarrollo de la obesidad y la recuperación metabólica ligada a la pérdida de peso corporal

El estado obeso está asociado a una insensibilidad en la respuesta a cambios en las condiciones de alimentación (Caimari et al., 2007; Picó et al., 2002). En estudios previos de nuestro grupo se mostró cómo las PBMC de animales de 6 meses con obesidad inducida por la ingesta crónica de dieta de cafetería reflejaban la insensibilidad al ayuno, característica de tejidos homeostáticos como el hígado o el tejido adiposo (Caimari et al., 2010a; Caimari et al., 2010c). En esta tesis se ha analizado la respuesta al ayuno-realimentación de genes clave implicados en la regulación del balance energético (*Fasn*, *Srebp1*, *Ppar γ* , *Cpt1a* y *Npy*) en PBMC de ratas alimentadas con dieta de cafetería a diferentes tiempos de administración de la dieta, a medida que los animales iban ganando peso. Las PBMC reflejaron una alteración en la respuesta al ayuno durante todo el desarrollo, incluso tras un solo mes de administración de la dieta, cuando los animales presentaban un 13% de sobrepeso, y posteriormente hasta alcanzarse un 29% de sobrepeso a punto final (tras 4 meses de administración de la dieta obesogénica). Esta insensibilidad a las condiciones de alimentación observada en PBMC fue similar a la observada en hígado y TAB (depósito retroperitoneal), y evidencia un deterioro en la capacidad de mantener el equilibrio homeostático, característica de animales obesos. Más específicamente, durante el desarrollo de la obesidad, las PBMC reflejaron problemas en la homeostasis de lípidos (movilización y de almacenamiento) por el hígado y el tejido adiposo en períodos agudos de ayuno y de realimentación, y también reflejaron el deterioro en la regulación hipotalámica de la ingesta de alimentos; todas estas alteraciones podrían estar contribuyendo a un aumento de la deposición de grasa. En definitiva, los cambios en la expresión génica en PBMC se pueden utilizar como predictores de la obesidad asociada a la ingesta de dietas hiperlipídicas. En particular, las alteraciones en la expresión en PBMC de genes homeostáticos clave podrían indicar alteraciones metabólicas que conducen a la obesidad y, por lo tanto, estas células constituyen una fuente, fácilmente obtenible, de biomarcadores asociados a una desregulación precoz de la homeostasis energética, potencialmente útil en las intervenciones dirigidas en la prevención de la obesidad (**manuscrito 1**).

Además de estudiar la insensibilidad a las condiciones de alimentación en PBMC durante el desarrollo de la obesidad, quisimos estudiar la capacidad que presentan estas células de reflejar la recuperación metabólica asociada a la pérdida de

peso en animales obesos. Para ello, en primer lugar caracterizamos un modelo animal de recuperación metabólica, modelo de post-cafetería. La dieta de cafetería administrada en animales adultos produjo un alto grado de obesidad e importantes complicaciones metabólicas asociadas a una adiposidad incrementada. Sin embargo, el reemplazo de esta dieta por una dieta equilibrada permitió la reversión del peso corporal y de la adiposidad, así como del daño metabólico (resistencia a la insulina, insensibilidad a la tolerancia oral a la glucosa y esteatosis hepática). En el modelo de post-cafetería también se recuperó la sensibilidad al ayuno tanto a nivel sérico, disminuyendo los niveles de leptina, glucosa, insulina y triglicéridos, como a nivel de expresión génica, disminuyendo la expresión génica de genes implicados en la síntesis de grasa (*Fasn* y *Srebp1*) y aumentando la expresión de genes implicados en la movilización y utilización de reservas energéticas (*Atgl*, *Cpt1a* y *Fgf21*). Por lo tanto, a diferencia de lo que ocurre cuando la dieta de cafetería es administrada en etapas tempranas de la vida, la obesidad inducida por la ingesta de dieta de cafetería administrada en edad adulta es reversible, siendo el grado de recuperación dependiente del tiempo de exposición a la misma. En definitiva, este estudio, evidencia la utilidad del modelo de post-cafetería para el estudio de los mecanismos implicados en la pérdida de peso corporal y la consiguiente recuperación metabólica (**manuscrito 2**).

Los análisis de expresión génica en muestras de PBMC del mismo modelo de post-cafetería mostraron como estas células son capaces de reflejar a nivel transcriptómico la recuperación metabólica. Las PBMC reflejaron la recuperación de la sensibilidad al ayuno, que se correlacionó con la pérdida de peso corporal, en los animales que revirtieron a una dieta control tras ser alimentados con una dieta de cafetería. Los resultados más robustos fueron los obtenidos para el gen *Npy*, especialmente útil como marcador de la sensibilidad al ayuno, ya que su respuesta al ayuno en PBMC no se vio afectada por la edad de los animales y, además, fue capaz de recuperar la respuesta al ayuno, evidenciando la recuperación metabólica, incluso a tiempos más cortos de exposición a una dieta equilibrada. Por tanto, las PBMC se perfilan como una fuente de biomarcadores que pueden reflejar la recuperación asociada a cambios en la alimentación, permitiendo monitorizar, a nivel metabólico, la efectividad de estrategias de pérdida de peso (**manuscrito 3**).

Otro aspecto que nos interesó fue el de estudiar el efecto sobre el sistema de control del peso corporal y la salud originado por diferentes dietas hiperlipídicas, comprobando también si las PBMC eran capaces de reflejar el impacto de estas dietas sobre el metabolismo. Estudios previos demuestran que la dieta de cafetería es la dieta rica en grasa, utilizada en estudios de obesidad, que mejor refleja la obesidad humana, ya que produce mayores alteraciones a nivel de peso corporal, adiposidad, parámetros séricos (glucosa, insulina) y a nivel de esteatosis hepática, que las dietas hiperlipídicas comerciales (Sampey et al., 2011). En este proyecto comparamos el efecto de una dieta de cafetería y de una dieta hiperlipídica comercial (que proporcionan porcentajes similares de grasa) no solo a nivel de diferentes parámetros metabólicos, sino también realizando un análisis de la expresión de genes clave del metabolismo energético en hígado, músculo, TAB y TAM. Nuestros resultados confirmaron que, aunque el estudio de expresión génica demostró efectos similares en ambas dietas, los efectos perjudiciales sobre el peso, la adiposidad corporal y demás parámetros metabólicos eran mayores en los animales alimentados con dieta de cafetería, confirmando que la dieta de cafetería es el modelo que refleja mejor la obesidad humana. De hecho, aunque la ingesta de dieta hiperlipídica comercial también va asociada a adiposidad incrementada y a alteraciones a nivel de expresión génica y alteraciones metabólicas

relacionadas con el síndrome metabólico, a diferencia de la dieta de cafetería, esta dieta no produjo un incremento significativo en el peso corporal (**manuscrito 2**).

Cuando analizamos el efecto en PBMC de los dos tipos de dietas hiperlipídicas sobre la expresión basal de genes implicados en diferentes procesos relacionados con la obesidad, pudimos observar que ambas inducen la aparición de un perfil obesogénico característico, alterando la expresión de genes del metabolismo lipídico (*Cpt1a*, *Fasn* y *Srebp1*), de genes que han sido relacionados con la obesidad inducida por la dieta (*Apob48r*, *Cebpb* y *Slc27a2*) y de genes inflamatorios (*Il-6* y *Tnfα*). Resultan especialmente interesantes como biomarcadores de obesidad aquellos genes cuya expresión se viera alterada por los dos tipos de dietas hiperlipídicas ya que, aunque la comercial no vaya ligada a aumento de peso, ambas producen alteraciones metabólicas. Además, interesan los genes cuya expresión se altere desde los primeros momentos de administración de las dietas obesogénicas, y que además sean capaces de revertir a sus niveles basales con la pérdida de peso. En este sentido, el gen *Cpt1a* resultó de especial interés. Por tanto, también con esta aproximación experimental pudimos comprobar la utilidad de las PBMC como fuente de marcadores transcriptómicos tempranos de ingesta de dietas hiperlipídicas que van asociadas a alteraciones metabólicas, aun en ausencia de obesidad, y también como fuente de biomarcadores de recuperación metabólica (**manuscrito 4**).

En resumen, las PBMC son una fuente de biomarcadores tempranos que evidencian las alteraciones metabólicas ligadas a la aparición de obesidad, y que son útiles para la detección precoz de la obesidad, momento en el que aún es posible aplicar terapias o estrategias para prevenir/curar el desarrollo de esta enfermedad. También son fuente de biomarcadores de recuperación metabólica asociada a pérdida de peso debido a cambios dietéticos. Estos biomarcadores son de utilidad tanto para comprobar la efectividad de las terapias de pérdida de peso como para analizar el efecto sobre el metabolismo de cambios dietéticos saludables. De manera interesante, este estudio abre nuevas posibilidades como puede ser la investigación de los efectos de compuestos bioactivos de los alimentos analizando cómo afectan a la expresión de biomarcadores en PBMC. De hecho, en este sentido, y a raíz de los resultados obtenidos en esta tesis, se ha iniciado un estudio aplicado en humanos en el que se usan PBMC en cultivo para evaluar el potencial bioactivo de los compuestos nutricionales. El estudio fue aprobado por el CEI-IB en septiembre de 2013 y tiene por título “Estudio de la utilidad de las células mononucleares de sangre periférica humanas *in vitro* para el análisis de las propiedades beneficiosas de compuestos bioactivos presentes en los alimentos con potenciales efectos sobre la obesidad y sus complicaciones (NUTRI-BLOOD)”.

2.- Las PBMC como material biológico para el estudio de la activación del tejido adiposo marrón y de la conversión de tejido adiposo blanco a marrón (marronización)

Debido al aumento exponencial de la obesidad se están estudiando diferentes terapias para tratar su desarrollo. Este tipo de terapias tienen un impacto clave sobre la ingesta energética, sobre el gasto energético o sobre ambos factores. Una de las dianas terapéuticas para incrementar el gasto energético consiste en la activación de la proteína desacoplante UCP1 del TAM, responsable de la disipación de energía en forma de calor, cuya activación tiene un papel clave en el control de peso corporal en roedores y en cuyo estudio nuestro grupo tiene una amplia experiencia (Palou et al.,

1998). En este sentido, desde que se descubrió la presencia de TAM en humanos adultos (Nedergaard et al., 2007), ha aumentado el interés sobre la activación del TAM y la inducción de la aparición de adipocitos con capacidad termogénica en el tejido adiposo blanco, los adipocitos *brite*. Tanto la activación del propio TAM como la inducción de la formación de adipocitos *brite* podrían ser útiles para el desarrollo de estrategias para combatir la obesidad y enfermedades relacionadas (Bonet et al., 2013; Sharp et al., 2012). Sin embargo, este tipo de estudios en humanos requiere de técnicas invasivas, como biopsias de tejido adiposo, o el uso de técnicas que utilizan isótopos radiactivos. Por ello sería interesante disponer de un material biológico de fácil obtención para el estudio del TAM. Para ello analizamos la capacidad de las PBMC de reflejar la activación del TAM y marronización del TAB ante diferentes estímulos (una dieta obesogénica y exposición al frío).

En roedores, las dietas hiperlipídicas incrementan la capacidad termogénica, aumentando la activación del TAM, para hacer frente al incremento de la ingesta calórica, disipando el exceso de energía consumido (Brooks et al., 1980; Rothwell and Stock, 1979). Además, aunque hasta el momento había mucha controversia sobre la capacidad de las dietas hiperlipídicas de inducir el proceso de marronización (Bonet et al., 2013; Fromme and Klingenspor, 2011; Hojna et al., 2012), hemos descrito cómo la ingesta de dietas hiperlipídicas induce la sobreexpresión de marcadores de adipocitos marrones y de adipocitos *brite* en TAB y también en TAM de ratas, probablemente en un intento de contrarrestar el incremento de obesidad (García-Ruiz et al.). Como parte de esta tesis, identificamos que, si bien no expresaban la *Ucp1*, las PBMC eran capaces de expresar otros marcadores clave adipocitos marrones (*Cidea*, *Ebf3*, *Eva1*, *Fbxo31*, *Fgf21*, *Prdm16* y *Tbx-15*) y de adipocitos *brite* (*Hoxc9*, *Slc27a1* y *Tmem26*), y mostraron un perfil de expresión similar al observado en el tejido adiposo de los animales alimentados con dietas hiperlipídicas. Estos resultados dan evidencias preliminares de que las PBMC podrían ser de utilidad para estudiar la activación del TAM y el proceso de marronización en respuesta, en este caso, a la ingesta de las dietas hiperlipídicas (**manuscrito 5**).

Tras estas primeras evidencias de la capacidad de las PBMC de reflejar el proceso de marronización, hacían falta más estudios, con estímulos más drásticos, para explorar el potencial de estas células como material biológico para el estudio del TAM. Por ello analizamos cómo se veía afectada la expresión de marcadores clave en PBMC de animales expuestos al frío, ya que este es uno de los mayores estímulos capaces de activar el TAM e inducir la aparición de adipocitos *brite* en depósitos de TAB. Los resultados señalan que tras una semana de exposición al frío (a 4°C) se produjo una importante remodelación del TAB retroperitoneal, que fue evidente sobre todo en ratas jóvenes (un mes de vida). Las PBMC fueron capaces de reflejar la marronización observada en el TAB de ratas jóvenes, caracterizada por el incremento en la expresión de *Cidea* (en PBMC y TAB) y por la aparición de un gran número adipocitos multiloculares CIDE-A y UCP1 positivos en el depósito graso analizado. (**manuscrito 6**).

Estos resultados, abren nuevos caminos, y posibilitan el estudio de la formación de *brite*, causada por el frío (o vías de señalización similares) en muestras sanguíneas con lo cual se abre la posibilidad de realizar estudios de marronización en humanos sin la necesidad de realizar pruebas invasivas (aplicación de técnicas que suponen uso de marcadores radiactivos u obtención de biopsias), tan solo disponiendo de pequeñas muestras de sangre.

Capítulo VI.- CONCLUSIONES

VI.- CONCLUSIONES

I.- Las PBMC reflejan la insensibilidad a las condiciones de alimentación característica de la obesidad desde etapas tempranas del desarrollo de dicha patología. Las PBMC reflejan la falta de respuesta al ayuno/realimentación de genes clave del metabolismo energético durante el desarrollo de la obesidad inducida por el consumo de dieta de cafetería. Concretamente, la desregulación de la homeostasis energética se observa ya desde el primer mes de consumo de la dieta, cuando los animales presentan un bajo grado de sobrepeso. Por ello, estas células se presentan como una fuente de biomarcadores tempranos de desequilibrio homeostático de utilidad en los estudios de prevención de obesidad.

II.- Las PBMC reflejan la recuperación metabólica asociada a la pérdida de peso. La obesidad y las alteraciones metabólicas producidas por el consumo de una dieta de cafetería en animales adultos son reversibles si ésta es reemplazada por una dieta balanceada. Las PBMC evidencian esta recuperación metabólica asociada a la pérdida de peso, ya que se recupera la respuesta al ayuno de genes clave en el metabolismo energético. La expresión de *Nyp* en PBMC es especialmente interesante como biomarcador de recuperación de la sensibilidad al ayuno. Las PBMC constituyen pues una fuente de biomarcadores de recuperación metabólica de utilidad en programas de pérdida de peso.

III.- Las PBMC desarrollan un perfil transcriptómico obesogénico en animales alimentados con dietas ricas en grasa. La ingesta de dieta de cafetería produce unas alteraciones más drásticas en el peso corporal y complicaciones asociadas al sobrepeso que la dieta hiperlipídica comercial. Sin embargo, ambas dietas producen un perfil de expresión génica en PBMC que es característico de un estado de obesidad y que permite predecirla. La expresión del gen *Cpt1a* se perfila como un biomarcador de interés para el estudio de la obesidad: su expresión se ve alterada desde etapas tempranas del desarrollo de la obesidad (marcador temprano) y con el consumo de diferentes dietas ricas en grasa, asociadas o no al desarrollo de sobrepeso. Además, su expresión se recupera al sustituir la dieta de cafetería por una dieta control (marcador de recuperación metabólica).

IV.- Las PBMC expresan marcadores relacionados con el tejido adiposo marrón que se inducen por la ingesta de dietas hiperlipídicas. Aunque las PBMC no expresan *Ucp1*, sí expresan algunos marcadores de adipocitos marrones/*brite* (*Cidea*, *Ebf3*, *Eval*, *Fbox31*, *Fgf21*, *Hoxc9*, *Prdm16*, *Slc27a1*, *Tbx15* y *Tmem26*), que siguen la misma regulación que la que se observa en tejido adiposo de animales alimentados con dietas hiperlipídicas. Las PBMC estarían pues reflejando la activación del TAM y una capacidad incrementada de remodelar el TAB a TAM en respuesta a dietas obesogénicas.

V.- Las PBMC expresan marcadores relacionados con el tejido adiposo marrón que se inducen ante un estímulo de frío. La exposición al frío induce la remodelación del TAB retroperitoneal a TAM, sobretodo en edades tempranas (ratas de un mes). Las PBMC reflejan este proceso de marronización del TAB inducido por la exposición al frío. Por tanto, las PBMC podrían considerarse como un material biológico mínimamente invasivo potencialmente útil para llevar a cabo estudios de marronización con aplicabilidad para ser usados en humanos.

VI.- CONCLUSIONS

I.- PBMC reflect the insensitivity to feeding conditions characteristic of obesity from early stages of the development of this pathology. PBMC reflect the lack of response to fasting/re-feeding of key energy metabolism genes during development of cafeteria-diet induced obesity. Specifically, energy homeostasis deregulation is observed from the first month of diet intake, when animals present a low degree of overweight. Thus, these cells can be presented as a source of early biomarkers of homeostatic imbalance that could be useful for studies of obesity prevention.

II.- PBMC reflect metabolic recovery related to weight loss. Obesity and metabolic complications produced by the intake of a cafeteria diet administered to adult animals are reversible if this diet is substituted by a control balance diet. PBMC show this metabolic recovery related to weight loss, evidenced as recovery of fasting response of key energy metabolism genes. *Npy* expression in PBMC is of especial interest to be considered as biomarker of fasting sensitivity recovery. Thus, PBMC constitute a source of biomarkers of metabolic recovery useful in body weight loss programs.

III.- PBMC develop an obesogenic transcriptomic profile in animals fed fat-rich diets. Cafeteria diet intake produces more drastic alterations in body weight and related complications than commercial high fat diet. However, both diets produce a gene expression pattern in PBMC, which is characteristic of obesity and allows predicting the disease. *Cpt1a* gene expression appears as a biomarker of interest for the study of obesity: its expression is altered from early stages of obesity development (early marker) and also with consumption of different hyperlipidic diets, related or not to the development of overweight. Moreover, its expression is recovered when substituting cafeteria diet by a control diet (marker of metabolic recovery)

IV.- PBMC express brown adipose tissue-related markers which are induced in response to the intake of hyperlipidic diets. Although PBMC do not express *Ucp1*, they do express some brown/brite adipocyte markers (*Cidea*, *Ebf3*, *Eva1*, *Fbox31*, *Fgf21*, *Hoxc9*, *Prdm16*, *Slc27a1*, *Tbx15* and *Tmem26*), which follow the same regulatory pattern to that observed in adipose tissue of animals fed high fat diets. PBMC would be reflecting BAT activation and increased capacity for white to BAT remodeling in response to obesogenic diets.

V.- PBMC express brown adipose tissue-related markers which are induced as result of cold exposure. Cold exposure induces remodeling of retroperitoneal WAT into BAT, mainly at young ages (one-month-old rats). PBMC reflect this WAT browning process induced by cold exposure. Thus, PBMC could be considered a potentially useful minimally invasive biological material to perform browning studies with applicability to be used in humans.

Capítulo VII.- BIBLIOGRAFÍA

VII.- BIBLIOGRAFÍA

- Abel, E.D. (2010). Free fatty acid oxidation in insulin resistance and obesity. *Heart Metab* 48, 5-10.
- Adeghate, E. (2008). Visfatin: structure, function and relation to diabetes mellitus and other dysfunctions. *Curr Med Chem* 15, 1851-1862.
- Al-Hasani, H., and Joost, H.G. (2005). Nutrition-/diet-induced changes in gene expression in white adipose tissue. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 19, 589-603.
- Aljada, A., Mohanty, P., Ghanim, H., Abdo, T., Tripathy, D., Chaudhuri, A., and Dandona, P. (2004). Increase in intranuclear nuclear factor kappaB and decrease in inhibitor kappaB in mononuclear cells after a mixed meal: evidence for a proinflammatory effect. *Am J Clin Nutr* 79, 682-690.
- Alokail, M.S., Al-Daghri, N.M., Mohammed, A.K., Vanhoutte, P., and Alenad, A. (2014). Increased TNF α , IL-6 and ErbB2 mRNA expression in peripheral blood leukocytes from breast cancer patients. *Med Oncol* 31, 38.
- Amengual, J., Ribot, J., Bonet, M.L., and Palou, A. (2010). Retinoic acid treatment enhances lipid oxidation and inhibits lipid biosynthesis capacities in the liver of mice. *Cell Physiol Biochem* 25, 657-666.
- Aranceta Bartrina, J. (2013). Public health and the prevention of obesity: failure or success? *Nutr Hosp* 28 *Suppl* 5, 128-137.
- Ashworth, C.J., Hoggard, N., Thomas, L., Mercer, J.G., Wallace, J.M., and Lea, R.G. (2000). Placental leptin. *Rev Reprod* 5, 18-24.
- Asrih, M., and Jornayvaz, F. (2013). Inflammation as a link between nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *J Endocrinol*.
- Aziz, H., Zaas, A., and Ginsburg, G.S. (2007). Peripheral blood gene expression profiling for cardiovascular disease assessment. *Genomic Med* 1, 105-112.
- Baine, M.J., Chakraborty, S., Smith, L.M., Mallya, K., Sasson, A.R., Brand, R.E., and Batra, S.K. (2011). Transcriptional profiling of peripheral blood mononuclear cells in pancreatic cancer patients identifies novel genes with potential diagnostic utility. *PLoS One* 6, e17014.
- Barbatelli, G., Murano, I., Madsen, L., Hao, Q., Jimenez, M., Kristiansen, K., Giacobino, J.P., De Matteis, R., and Cinti, S. (2010). The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298, E1244-1253.
- Barbera, M.J., Schluter, A., Pedraza, N., Iglesias, R., Villarroya, F., and Giralt, M. (2001). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activates transcription of the brown fat uncoupling protein-1 gene. A link between regulation of the thermogenic and lipid oxidation pathways in the brown fat cell. *J Biol Chem* 276, 1486-1493.
- Barneda, D., Frontini, A., Cinti, S., and Christian, M. (2013). Dynamic changes in lipid droplet-associated proteins in the "browning" of white adipose tissues. *Biochim Biophys Acta* 1831, 924-933.
- Becker, A.M., Dao, K.H., Han, B.K., Kornu, R., Lakhanpal, S., Mobley, A.B., Li, Q.Z., Lian, Y., Wu, T., Reimold, A.M., *et al.* (2013). SLE peripheral blood B cell, T cell and myeloid cell transcriptomes display unique profiles and each subset contributes to the interferon signature. *PLoS One* 8, e67003.

Bellows, C.F., Zhang, Y., Simmons, P.J., Khalsa, A.S., and Kolonin, M.G. (2011). Influence of BMI on level of circulating progenitor cells. *Obesity (Silver Spring)* 19, 1722-1726.

Berry, D.C., and Noy, N. (2009). All-trans-retinoic acid represses obesity and insulin resistance by activating both peroxisome proliferation-activated receptor beta/delta and retinoic acid receptor. *Mol Cell Biol* 29, 3286-3296.

Bokarewa, M., Nagaev, I., Dahlberg, L., Smith, U., and Tarkowski, A. (2005). Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties. *J Immunol* 174, 5789-5795.

Bonet, M.L., Oliver, J., Picó, C., Felipe, F., Ribot, J., Cinti, S., and Palou, A. (2000). Opposite effects of feeding a vitamin A-deficient diet and retinoic acid treatment on brown adipose tissue uncoupling protein 1 (UCP1), UCP2 and leptin expression. *J Endocrinol* 166, 511-517.

Bonet, M.L., Oliver, P., and Palou, A. (2013). Pharmacological and nutritional agents promoting browning of white adipose tissue. *Biochim Biophys Acta* 1831, 969-985.

Bonet, M.L., Ribot, J., and Palou, A. (2012). Lipid metabolism in mammalian tissues and its control by retinoic acid. *Biochim Biophys Acta* 1821, 177-189.

Boss, O., and Farmer, S.R. (2012). Recruitment of brown adipose tissue as a therapy for obesity-associated diseases. *Front Endocrinol (Lausanne)* 3, 14.

Boucher, P., de Lorgeril, M., Salen, P., Crozier, P., Delaye, J., Vallon, J.J., Geysant, A., and Dante, R. (1998). Effect of dietary cholesterol on low density lipoprotein-receptor, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, and low density lipoprotein receptor-related protein mRNA expression in healthy humans. *Lipids* 33, 1177-1186.

Boucher, P., Seree, E., Vidon, C., de Souza, A.C., Villard, P.H., Chambon, R., Barra, Y., and Vallon, J.J. (2000). Dietary lipids affect human ethanol-inducible CYP2E1 gene expression in vivo in mononuclear cells. *Life Sci* 67, 1307-1316.

Bouwens, M., Afman, L.A., and Muller, M. (2007). Fasting induces changes in peripheral blood mononuclear cell gene expression profiles related to increases in fatty acid beta-oxidation: functional role of peroxisome proliferator activated receptor alpha in human peripheral blood mononuclear cells. *Am J Clin Nutr* 86, 1515-1523.

Bouwens, M., Afman, L.A., and Müller, M. (2008). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in human peripheral blood mononuclear cells reveals an individual gene expression profile response. *BMC Genomics* 9, 262.

Bouwens, M., van de Rest, O., Dellschaft, N., Bromhaar, M.G., de Groot, L.C., Geleijnse, J.M., Müller, M., and Afman, L.A. (2009). Fish-oil supplementation induces antiinflammatory gene expression profiles in human blood mononuclear cells. *Am J Clin Nutr* 90, 415-424.

Bray, G.A., and Popkin, B.M. (1998). Dietary fat intake does affect obesity! *Am J Clin Nutr* 68, 1157-1173.

Brindle, N.P., Zammit, V.A., and Pogson, C.I. (1985). Regulation of carnitine palmitoyltransferase activity by malonyl-CoA in mitochondria from sheep liver, a tissue with a low capacity for fatty acid synthesis. *Biochem J* 232, 177-182.

Brisbois, T.D., Farmer, A.P., and McCargar, L.J. (2012). Early markers of adult obesity: a review. *Obes Rev* 13, 347-367.

Brock, R.W., and Dorman, R.B. (2007). Obesity, insulin resistance and hepatic perfusion. *Microcirculation* 14, 339-347.

Brooks, S.L., Rothwell, N.J., Stock, M.J., Goodbody, A.E., and Trayhurn, P. (1980). Increased proton conductance pathway in brown adipose tissue mitochondria of rats exhibiting diet-induced thermogenesis. *Nature* 286, 274-276.

Browning, L.M., Walker, C.G., Mander, A.P., West, A.L., Gambell, J., Madden, J., Calder, P.C., and Jebb, S.A. (2014). Compared with Daily, Weekly n-3 PUFA Intake Affects the Incorporation of Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid into Platelets and Mononuclear Cells in Humans. *J Nutr*.

Brunt, E.M., Janney, C.G., Di Bisceglie, A.M., Neuschwander-Tetri, B.A., and Bacon, B.R. (1999). Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 94, 2467-2474.

Buettner, R., Parhofer, K.G., Woenckhaus, M., Wrede, C.E., Kunz-Schughart, L.A., Schölmerich, J., and Bollheimer, L.C. (2006). Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J Mol Endocrinol* 36, 485-501.

Buettner, R., Schölmerich, J., and Bollheimer, L.C. (2007). High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)* 15, 798-808.

Burczynski, M.E., and Dorner, A.J. (2006). Transcriptional profiling of peripheral blood cells in clinical pharmacogenomic studies. *Pharmacogenomics* 7, 187-202.

Caimari, A., Oliver, P., Keijer, J., and Palou, A. (2010a). Peripheral blood mononuclear cells as a model to study the response of energy homeostasis-related genes to acute changes in feeding conditions. *Omics* 14, 129-141.

Caimari, A., Oliver, P., and Palou, A. (2007). Regulation of adiponutrin expression by feeding conditions in rats is altered in the obese state. *Obesity (Silver Spring)* 15, 591-599.

Caimari, A., Oliver, P., and Palou, A. (2008). Impairment of nutritional regulation of adipose triglyceride lipase expression with age. *Int J Obes (Lond)* 32, 1193-1200.

Caimari, A., Oliver, P., and Palou, A. (2012). Adipose triglyceride lipase expression and fasting regulation are differently affected by cold exposure in adipose tissues of lean and obese Zucker rats. *J Nutr Biochem* 23, 1041-1050.

Caimari, A., Oliver, P., Rodenburg, W., Keijer, J., and Palou, A. (2010b). Feeding conditions control the expression of genes involved in sterol metabolism in peripheral blood mononuclear cells of normoweight and diet-induced (cafeteria) obese rats. *J Nutr Biochem* 21, 1127-1133.

Caimari, A., Oliver, P., Rodenburg, W., Keijer, J., and Palou, A. (2010c). Slc27a2 expression in peripheral blood mononuclear cells as a molecular marker for overweight development. *Int J Obes (Lond)* 34, 831-839.

Cannon, B., and Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84, 277-359.

Cappuzzello, C., Napolitano, M., Arcelli, D., Melillo, G., Melchionna, R., Di Vito, L., Carlini, D., Silvestri, L., Brugaletta, S., Liuzzo, G., *et al.* (2009). Gene expression profiles in peripheral blood mononuclear cells of chronic heart failure patients. *Physiol Genomics* 38, 233-240.

Casabiell, X., Piñeiro, V., Tomé, M.A., Peinó, R., Diéguez, C., and Casanueva, F.F. (1997). Presence of leptin in colostrum and/or breast milk from lactating mothers: a potential role in the regulation of neonatal food intake. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 4270-4273.

Cawthorn, W.P., Scheller, E.L., and MacDougald, O.A. (2012). Adipose tissue stem cells meet preadipocyte commitment: going back to the future. *J Lipid Res* 53, 227-246.

Celi, F.S. (2009). Brown adipose tissue--when it pays to be inefficient. *N Engl J Med* 360, 1553-1556.

Champigny, O., and Ricquier, D. (1996). Evidence from in vitro differentiating cells that adrenoceptor agonists can increase uncoupling protein mRNA level in adipocytes of adult humans: an RT-PCR study. *J Lipid Res* 37, 1907-1914.

Chang, D.H., Rutledge, J.R., Patel, A.A., Heerdt, B.G., Augenlicht, L.H., and Korst, R.J. (2013). The effect of lung cancer on cytokine expression in peripheral blood mononuclear cells. *PLoS One* 8, e64456.

Chaussabel, D., Allman, W., Mejias, A., Chung, W., Bennett, L., Ramilo, O., Pascual, V., Palucka, A.K., and Banchereau, J. (2005). Analysis of significance patterns identifies ubiquitous and disease-specific gene-expression signatures in patient peripheral blood leukocytes. *Ann N Y Acad Sci* 1062, 146-154.

Chen, J., Zhang, X., Zhang, H., Lin, J., Zhang, C., Wu, Q., and Ding, X. (2013). Elevated Klotho promoter methylation is associated with severity of chronic kidney disease. *PLoS One* 8, e79856.

Chen, Y.J., Chen, C.C., Li, T.K., Wang, P.H., Liu, L.R., Chang, F.Y., Wang, Y.C., Yu, Y.H., Lin, S.P., Mersmann, H.J., *et al.* (2012). Docosahexaenoic acid suppresses the expression of FoxO and its target genes. *J Nutr Biochem* 23, 1609-1616.

Cho, H.J., Park, J., Lee, H.W., Lee, Y.S., and Kim, J.B. (2004). Regulation of adipocyte differentiation and insulin action with rapamycin. *Biochem Biophys Res Commun* 321, 942-948.

Cigna, D., D'Anna, C., Zizzo, C., Francofonte, D., Sorrentino, I., Colomba, P., Albeggiani, G., Armini, A., Bianchi, L., Bini, L., *et al.* (2013). Alteration of proteomic profiles in PBMC isolated from patients with Fabry disease: preliminary findings. *Mol Biosyst* 9, 1162-1168.

Cinti, S. (2005). The adipose organ. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 73, 9-15.

Cinti, S. (2009). Transdifferentiation properties of adipocytes in the adipose organ. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297, E977-986.

Cinti, S., Cancellò, R., Zingaretti, M.C., Ceresi, E., De Matteis, R., Giordano, A., Himms-Hagen, J., and Ricquier, D. (2002). CL316,243 and cold stress induce heterogeneous expression of UCP1 mRNA and protein in rodent brown adipocytes. *J Histochem Cytochem* 50, 21-31.

Cinti, S., de Matteis, R., Ceresi, E., Picó, C., Oliver, J., Oliver, P., Palou, A., Obrador, A., and Maffei, C. (2001). Leptin in the human stomach. *Gut* 49, 155.

Cinti, S., Matteis, R.D., Picó, C., Ceresi, E., Obrador, A., Maffei, C., Oliver, J., and Palou, A. (2000). Secretory granules of endocrine and chief cells of human stomach mucosa contain leptin. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24, 789-793.

Clément, K., Vaisse, C., Lahlou, N., Cabrol, S., Pelloux, V., Cassuto, D., Gourmelen, M., Dina, C., Chambaz, J., Lacorte, J.M., *et al.* (1998). A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* 392, 398-401.

Coelho, D.F., Pereira-Lancha, L.O., Chaves, D.S., Diwan, D., Ferraz, R., Campos-Ferraz, P.L., Poortmans, J.R., and Lancha Junior, A.H. (2011). Effect of high-fat diets on body composition, lipid metabolism and insulin sensitivity, and the role of exercise on these parameters. *Braz J Med Biol Res* 44, 966-972.

- Cohen, P., Levy, J.D., Zhang, Y., Frontini, A., Kolodin, D.P., Svensson, K.J., Lo, J.C., Zeng, X., Ye, L., Khandekar, M.J., *et al.* (2014). Ablation of PRDM16 and beige adipose causes metabolic dysfunction and a subcutaneous to visceral fat switch. *Cell* *156*, 304-316.
- Coleman, D.L. (1978). Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetologia* *14*, 141-148.
- Cousin, B., Cinti, S., Morroni, M., Raimbault, S., Ricquier, D., Pénicaud, L., and Casteilla, L. (1992). Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose tissue: molecular and morphological characterization. *J Cell Sci* *103 (Pt 4)*, 931-942.
- Covar, R., Gleason, M., Macomber, B., Stewart, L., Szeffler, P., Engelhardt, K., Murphy, J., Liu, A., Wood, S., DeMichele, S., *et al.* (2010). Impact of a novel nutritional formula on asthma control and biomarkers of allergic airway inflammation in children. *Clin Exp Allergy* *40*, 1163-1174.
- Crujeiras, A.B., Parra, D., Goyenechea, E., and Martínez, J.A. (2008a). Sirtuin gene expression in human mononuclear cells is modulated by caloric restriction. *Eur J Clin Invest* *38*, 672-678.
- Crujeiras, A.B., Parra, D., Milagro, F.I., Goyenechea, E., Larrarte, E., Margareto, J., and Martínez, J.A. (2008b). Differential expression of oxidative stress and inflammation related genes in peripheral blood mononuclear cells in response to a low-calorie diet: a nutrigenomics study. *OMICS* *12*, 251-261.
- Cunningham, S., Leslie, P., Hopwood, D., Illingworth, P., Jung, R.T., Nicholls, D.G., Peden, N., Rafael, J., and Rial, E. (1985). The characterization and energetic potential of brown adipose tissue in man. *Clin Sci (Lond)* *69*, 343-348.
- d'Ettoire, G., Zaffiri, L., Ceccarelli, G., Mastroianni, C.M., and Vullo, V. (2010). The role of HIV-DNA testing in clinical practice. *New Microbiol* *33*, 1-11.
- de Lange, P., Moreno, M., Silvestri, E., Lombardi, A., Goglia, F., and Lanni, A. (2007). Fuel economy in food-deprived skeletal muscle: signaling pathways and regulatory mechanisms. *FASEB J* *21*, 3431-3441.
- de Mello, V.D., Kolehmainen, M., Schwab, U., Mager, U., Laaksonen, D.E., Pulkkinen, L., Niskanen, L., Gylling, H., Atalay, M., Rauramaa, R., *et al.* (2008). Effect of weight loss on cytokine messenger RNA expression in peripheral blood mononuclear cells of obese subjects with the metabolic syndrome. *Metabolism* *57*, 192-199.
- de Mello, V.D., Kolehmainen, M., Schwab, U., Pulkkinen, L., and Uusitupa, M. (2012). Gene expression of peripheral blood mononuclear cells as a tool in dietary intervention studies: What do we know so far? *Mol Nutr Food Res* *56*, 1160-1172.
- de Wilde, J., Smit, E., Mohren, R., Boekschoten, M.V., de Groot, P., van den Berg, S.A., Bijland, S., Voshol, P.J., van Dijk, K.W., de Wit, N.W., *et al.* (2009). An 8-week high-fat diet induces obesity and insulin resistance with small changes in the muscle transcriptome of C57BL/6J mice. *J Nutrigenet Nutrigenomics* *2*, 280-291.
- Delves, P.J., Martin, S.J., Burton, D.R., and Roitt, I.M. (2011). *Roitt's essential Immunology*, Ed. Wiley-Blackell. 12 edición edn.
- Dhillon, W.S. (2007). Appetite regulation: an overview. *Thyroid* *17*, 433-445.
- Distel, E., Penot, G., Cadoudal, T., Balguy, I., Durant, S., and Benelli, C. (2012). Early induction of a brown-like phenotype by rosiglitazone in the epicardial adipose tissue of fatty Zucker rats. *Biochimie* *94*, 1660-1667.
- do Amaral, C.L., Milagro, F.I., Curi, R., and Martínez, J.A. (2014). DNA methylation pattern in overweight women under an energy-restricted diet supplemented with fish oil. *Biomed Res Int* *2014*, 675021.

Dziedzic, B., Szemraj, J., Bartkowiak, J., and Walczewska, A. (2007). Various dietary fats differentially change the gene expression of neuropeptides involved in body weight regulation in rats. *J Neuroendocrinol* *19*, 364-373.

Díaz-Rúa, R., García-Ruiz, E., Caimari, A., Palou, A., and Oliver, P. (2014). Sustained exposure to diets with an unbalanced macronutrient proportion alters key genes involved in energy homeostasis and obesity-related metabolic parameters in rats. *Food and function*.

Ebal, E., Cavalié, H., Michaux, O., and Lac, G. (2007). Effect of a lipid-enriched diet on body composition and some regulatory hormones of food intake in growing rats. *Ann Endocrinol (Paris)* *68*, 366-371.

Estadella, D., Oyama, L.M., Dâmaso, A.R., Ribeiro, E.B., and Oller Do Nascimento, C.M. (2004). Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. *Nutrition* *20*, 218-224.

Evans, R.M., Barish, G.D., and Wang, Y.X. (2004). PPARs and the complex journey to obesity. *Nat Med* *10*, 355-361.

Falcon, A., Doege, H., Fluitt, A., Tsang, B., Watson, N., Kay, M.A., and Stahl, A. (2010). FATP2 is a hepatic fatty acid transporter and peroxisomal very long-chain acyl-CoA synthetase. *Am J Physiol Endocrinol Metab* *299*, E384-393.

Feldmann, H.M., Golozoubova, V., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2009). UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. *Cell Metab* *9*, 203-209.

Finn, P.F., and Dice, J.F. (2006). Proteolytic and lipolytic responses to starvation. *Nutrition* *22*, 830-844.

Fisher, F.M., Kleiner, S., Douris, N., Fox, E.C., Mepani, R.J., Verdeguer, F., Wu, J., Kharitonov, A., Flier, J.S., Maratos-Flier, E., *et al.* (2012). FGF21 regulates PGC-1 α and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev* *26*, 271-281.

Fjeldborg, K., Pedersen, S.B., Møller, H.J., Christiansen, T., Bennetzen, M., and Richelsen, B. (2014). Human adipose tissue macrophages are enhanced but changed to an anti-inflammatory profile in obesity. *J Immunol Res* *2014*, 309548.

Fleury, C., Neverova, M., Collins, S., Raimbault, S., Champigny, O., Levi-Meyrueis, C., Bouillaud, F., Seldin, M.F., Surwit, R.S., Ricquier, D., *et al.* (1997). Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat Genet* *15*, 269-272.

Folch, J., Lees, M., and Sloane Stanley, G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* *226*, 497-509.

Fromme, T., and Klingenspor, M. (2011). Uncoupling protein 1 expression and high-fat diets. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* *300*, R1-8.

Frontini, A., Vitali, A., Perugini, J., Murano, I., Romiti, C., Ricquier, D., Guerrieri, M., and Cinti, S. (2013). White-to-brown transdifferentiation of omental adipocytes in patients affected by pheochromocytoma. *Biochim Biophys Acta* *1831*, 950-959.

Fujimoto, S., Mochizuki, K., Shimada, M., Hori, T., Murayama, Y., Ohashi, N., and Goda, T. (2010). Insulin resistance induced by a high-fat diet is associated with the induction of genes related to leukocyte activation in rat peripheral leukocytes. *Life Sci* *87*, 679-685.

Fuster, A., Oliver, P., Sánchez, J., Picó, C., and Palou, A. (2009). UCP1 and oxidative capacity of adipose tissue in adult ferrets (*Mustela putorius furo*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* *153*, 106-112.

Gabrielsson, B.G., Olofsson, L.E., Sjögren, A., Jernås, M., Elander, A., Lönn, M., Rudemo, M., and Carlsson, L.M. (2005). Evaluation of reference genes for studies of gene expression in human adipose tissue. *Obes Res* 13, 649-652.

Gale, S.M., Castracane, V.D., and Mantzoros, C.S. (2004). Energy homeostasis, obesity and eating disorders: recent advances in endocrinology. *J Nutr* 134, 295-298.

Gallou-Kabani, C., Vigé, A., Gross, M.S., Rabès, J.P., Boileau, C., Larue-Achagiotis, C., Tomé, D., Jais, J.P., and Junien, C. (2007). C57BL/6J and A/J mice fed a high-fat diet delineate components of metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring)* 15, 1996-2005.

Ganapathi, S.K., Beggs, A.D., Hodgson, S.V., and Kumar, D. (2014). Expression and DNA methylation of TNF, IFNG and FOXP3 in colorectal cancer and their prognostic significance. *Br J Cancer*.

García, A.P., Palou, M., Priego, T., Sánchez, J., Palou, A., and Picó, C. (2010). Moderate caloric restriction during gestation results in lower arcuate nucleus NPY- and alphaMSH-neurons and impairs hypothalamic response to fed/fasting conditions in weaned rats. *Diabetes Obes Metab* 12, 403-413.

García-Ruiz, E., Reynés, B., Díaz-Rúa, R., Oliver, P., and Palou, A. The intake of high fat diets induces the acquisition of brown adipocyte gene expression features in white adipose tissue. Submitted.

Garruti, G., and Ricquier, D. (1992). Analysis of uncoupling protein and its mRNA in adipose tissue deposits of adult humans. *Int J Obes Relat Metab Disord* 16, 383-390.

Gartner, L.P., and Hiatt, J.L. (2003). *Atlas Color de Histología.*, 3 edición edn.

Gburcik, V., Cawthorn, W.P., Nedergaard, J., Timmons, J.A., and Cannon, B. (2012). An essential role for Tbx15 in the differentiation of brown and "brite" but not white adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 303, E1053-1060.

Ghanim, H., Aljada, A., Hofmeyer, D., Syed, T., Mohanty, P., and Dandona, P. (2004). Circulating mononuclear cells in the obese are in a proinflammatory state. *Circulation* 110, 1564-1571.

Gianturco, S.H., Ramprasad, M.P., Song, R., Li, R., Brown, M.L., and Bradley, W.A. (1998). Apolipoprotein B-48 or its apolipoprotein B-100 equivalent mediates the binding of triglyceride-rich lipoproteins to their unique human monocyte-macrophage receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18, 968-976.

Giralt, M., and Villarroya, F. (2013). White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions? *Endocrinology* 154, 2992-3000.

Goldstein, S., Blecher, M., Binder, R., Perrino, P.V., and Recant, L. (1975). Hormone receptors, 5. Binding of glucagon and insulin to human circulating mononuclear cells in diabetes mellitus. *Endocr Res Commun* 2, 367-376.

Goleva, E., Jackson, L.P., Gleason, M., and Leung, D.Y. (2012). Usefulness of PBMCs to predict clinical response to corticosteroids in asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol* 129, 687-693.e681.

Goyenechea, E., Crujeiras, A.B., Abete, I., and Martínez, J.A. (2009a). Expression of two inflammation-related genes (RIPK3 and RNF216) in mononuclear cells is associated with weight-loss regain in obese subjects. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 2, 78-84.

Goyenechea, E., Parra, D., Crujeiras, A.B., Abete, I., and Martínez, J.A. (2009b). A nutrigenomic inflammation-related PBMC-based approach to predict the weight-loss regain in obese subjects. *Ann Nutr Metab* 54, 43-51.

Gray, P., Gabriel, B., Thies, F., and Gray, S.R. (2012). Fish oil supplementation augments post-exercise immune function in young males. *Brain Behav Immun* 26, 1265-1272.

Guo, J., Jou, W., Gavrilova, O., and Hall, K.D. (2009). Persistent diet-induced obesity in male C57BL/6 mice resulting from temporary obesigenic diets. *PLoS One* 4, e5370.

Harrington, M.E., and Coscina, D.V. (1983). Early weight gain and behavioral responsivity as predictors of dietary obesity in rats. *Physiol Behav* 30, 763-770.

Hecker, M., Thamilarasan, M., Koczan, D., Schröder, I., Flechtner, K., Freiesleben, S., Füllen, G., Thiesen, H.J., and Zettl, U.K. (2013). MicroRNA expression changes during interferon-beta treatment in the peripheral blood of multiple sclerosis patients. *Int J Mol Sci* 14, 16087-16110.

Hermisdorff, H.H., Puchau, B., Zulet, M.A., and Martínez, J.A. (2010). Association of body fat distribution with proinflammatory gene expression in peripheral blood mononuclear cells from young adult subjects. *OMICS* 14, 297-307.

Hill, J.O., and Peters, J.C. (1998). Environmental contributions to the obesity epidemic. *Science* 280, 1371-1374.

Hill, J.O., Wyatt, H.R., and Peters, J.C. (2012). Energy balance and obesity. *Circulation* 126, 126-132.

Hill, J.O., Wyatt, H.R., and Peters, J.C. (2013). The Importance of Energy Balance. In *Obesity and Weight Management*, pp. 27-31.

Hojna, S., Jordan, M.D., Kollias, H., and Pausova, Z. (2012). High-fat diet induces emergence of brown-like adipocytes in white adipose tissue of spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 35, 279-286.

Hondares, E., Iglesias, R., Giralt, A., Gonzalez, F.J., Giralt, M., Mampel, T., and Villarroya, F. (2011). Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. *J Biol Chem* 286, 12983-12990.

Horton, J.D., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2002). SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 109, 1125-1131.

Horton, J.D., and Shimomura, I. (1999). Sterol regulatory element-binding proteins: activators of cholesterol and fatty acid biosynthesis. *Curr Opin Lipidol* 10, 143-150.

Howard, B.V., Klimes, I., Vasquez, B., Brady, D., Nagulesparan, M., and Unger, R.H. (1984). The antilipolytic action of insulin in obese subjects with resistance to its glucoregulatory action. *J Clin Endocrinol Metab* 58, 544-548.

Hryniewicz-Jankowska, A., Choudhary, P.K., and Goodman, S.R. (2007). Variation in the monocyte proteome. *Exp Biol Med (Maywood)* 232, 967-976.

Hsu, I.R., Kim, S.P., Kabir, M., and Bergman, R.N. (2007). Metabolic syndrome, hyperinsulinemia, and cancer. *Am J Clin Nutr* 86, s867-871.

Hsu, S.M., Raine, L., and Fanger, H. (1981). Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29, 577-580.

Inokuma, K., Ogura-Okamatsu, Y., Toda, C., Kimura, K., Yamashita, H., and Saito, M. (2005). Uncoupling protein 1 is necessary for norepinephrine-induced glucose utilization in brown adipose tissue. *Diabetes* 54, 1385-1391.

Ishibashi, J., and Seale, P. (2010). Medicine. Beige can be slimming. *Science* 328, 1113-1114.

Jankovic, A., Korac, A., Buzadzic, B., Otasevic, V., Stancic, A., Vucetic, M., Markelic, M., Velickovic, K., Golic, I., and Korac, B. (2013). Endocrine and

metabolic signaling in retroperitoneal white adipose tissue remodeling during cold acclimation. *J Obes* 2013, 937572.

Jiang, G., and Zhang, B.B. (2003). Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284, E671-678.

Johnson, J.A., Fried, S.K., Pi-Sunyer, F.X., and Albu, J.B. (2001). Impaired insulin action in subcutaneous adipocytes from women with visceral obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280, E40-49.

Jolly, R.A., Ciurlionis, R., Morfitt, D., Helgren, M., Patterson, R., Ulrich, R.G., and Waring, J.F. (2004). Microvesicular steatosis induced by a short chain fatty acid: effects on mitochondrial function and correlation with gene expression. *Toxicol Pathol* 32 Suppl 2, 19-25.

Junqueira, L.C., and Carneiro, J. (2005). *Histología básica.*, Ed. Masson. 6 edición edn.

Jéquier, E. (2002). Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Ann N Y Acad Sci* 967, 379-388.

Kelley, D.E. (2005). Skeletal muscle fat oxidation: timing and flexibility are everything. *J Clin Invest* 115, 1699-1702.

Kern, P.A., Di Gregorio, G.B., Lu, T., Rassouli, N., and Ranganathan, G. (2003). Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor-alpha expression. *Diabetes* 52, 1779-1785.

Kerner, J., and Hoppel, C. (2000). Fatty acid import into mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1486, 1-17.

Kershaw, E.E., Hamm, J.K., Verhagen, L.A., Peroni, O., Katic, M., and Flier, J.S. (2006). Adipose triglyceride lipase: function, regulation by insulin, and comparison with adiponutrin. *Diabetes* 55, 148-157.

Kersten, S. (2001). Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep* 2, 282-286.

Khymenets, O., Fitó, M., Covas, M.I., Farré, M., Pujadas, M.A., Muñoz, D., Konstantinidou, V., and de la Torre, R. (2009). Mononuclear cell transcriptome response after sustained virgin olive oil consumption in humans: an exploratory nutrigenomics study. *OMICS* 13, 7-19.

Klaus, S. (2004). Adipose tissue as a regulator of energy balance. *Curr Drug Targets* 5, 241-250.

Kmieć, Z. (2006). Central regulation of food intake in ageing. *J Physiol Pharmacol* 57 Suppl 6, 7-16.

Konieczna, J., Sánchez, J., van Schothorst, E.M., Torrens, J.M., Bunschoten, A., Palou, M., Picó, C., Keijer, J., and Palou, A. (2014). Identification of early transcriptome-based biomarkers related to lipid metabolism in peripheral blood mononuclear cells of rats nutritionally programmed for improved metabolic health. *Genes Nutr* 9, 366.

Kopecny, J., Clarke, G., Enerbäck, S., Spiegelman, B., and Kozak, L.P. (1995). Expression of the mitochondrial uncoupling protein gene from the aP2 gene promoter prevents genetic obesity. *J Clin Invest* 96, 2914-2923.

Kopecný, J., Hodný, Z., Rossmeisl, M., Syrový, I., and Kozak, L.P. (1996). Reduction of dietary obesity in aP2-Ucp transgenic mice: physiology and adipose tissue distribution. *Am J Physiol* 270, E768-775.

Korner, J., Woods, S.C., and Woodworth, K.A. (2009). Regulation of energy homeostasis and health consequences in obesity. *Am J Med* 122, S12-18.

- Kozak, L.P., and Koza, R.A. (1999). Mitochondria uncoupling proteins and obesity: molecular and genetic aspects of UCP1. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23 *Suppl 6*, S33-37.
- Kus, V., Prazak, T., Brauner, P., Hensler, M., Kuda, O., Flachs, P., Janovska, P., Medrikova, D., Rossmeisl, M., Jilkova, Z., *et al.* (2008). Induction of muscle thermogenesis by high-fat diet in mice: association with obesity-resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295, E356-367.
- Lalanza, J.F., Caimari, A., del Bas, J.M., Torregrosa, D., Cigarroa, I., Pallàs, M., Capdevila, L., Arola, L., and Escorihuela, R.M. (2014). Effects of a post-weaning cafeteria diet in young rats: metabolic syndrome, reduced activity and low anxiety-like behaviour. *PLoS One* 9, e85049.
- Laplante, M., and Sabatini, D.M. (2009). An emerging role of mTOR in lipid biosynthesis. *Curr Biol* 19, R1046-1052.
- Lasar, D., Julius, A., Fromme, T., and Klingenspor, M. (2013). Browning attenuates murine white adipose tissue expansion during postnatal development. *Biochim Biophys Acta* 1831, 960-968.
- Lecoultre, V., and Ravussin, E. (2011). Brown adipose tissue and aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 14, 1-6.
- Lee, K., Kerner, J., and Hoppel, C.L. (2011). Mitochondrial carnitine palmitoyltransferase 1a (CPT1a) is part of an outer membrane fatty acid transfer complex. *J Biol Chem* 286, 25655-25662.
- Lee, M.J., Wu, Y., and Fried, S.K. (2013a). Adipose tissue heterogeneity: implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. *Mol Aspects Med* 34, 1-11.
- Lee, P., Werner, C.D., Kebebew, E., and Celi, F.S. (2013b). Functional thermogenic beige adipogenesis is inducible in human neck fat. *Int J Obes (Lond)*.
- Lee, Y.H., Petkova, A.P., Mottillo, E.P., and Granneman, J.G. (2012). In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by β 3-adrenoceptor activation and high-fat feeding. *Cell Metab* 15, 480-491.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., and Cox, M.M. (2000). Principles of Biochemistry, third edition edn.
- Levin, B.E., and Dunn-Meynell, A.A. (2002). Defense of body weight depends on dietary composition and palatability in rats with diet-induced obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282, R46-54.
- Levin, B.E., and Keeseey, R.E. (1998). Defense of differing body weight set points in diet-induced obese and resistant rats. *Am J Physiol* 274, R412-419.
- Li, J., Yu, X., Pan, W., and Unger, R.H. (2002). Gene expression profile of rat adipose tissue at the onset of high-fat-diet obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282, E1334-1341.
- Lien, A.S., Cho, Y.H., and Tsai, J.L. (2013). [Effectiveness evaluation of healthy lifestyle interventions in childhood obesity prevention: a systematic review]. *Hu Li Za Zhi* 60, 33-42.
- Liew, C.C., Ma, J., Tang, H.C., Zheng, R., and Dempsey, A.A. (2006). The peripheral blood transcriptome dynamically reflects system wide biology: a potential diagnostic tool. *J Lab Clin Med* 147, 126-132.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- Lladó, I., Pons, A., and Palou, A. (1996). Changes in fatty acid composition in rat adipose tissue induced by dietary obesity. *Biochem Mol Biol Int* 40, 295-303.

Lladó, I., Proenza, A.M., Serra, F., Palou, A., and Pons, A. (1991). Dietary-induced permanent changes in brown and white adipose tissue composition in rats. *Int J Obes* 15, 415-419.

Lo, K.A., and Sun, L. (2013). Turning WAT into BAT: a review on regulators controlling the browning of white adipocytes. *Biosci Rep* 33.

Loncar, D. (1991). Convertible adipose tissue in mice. *Cell Tissue Res* 266, 149-161.

Lottenberg, A.M., Afonso, M.a.S., Lavrador, M.S., Machado, R.M., and Nakandakare, E.R. (2012). The role of dietary fatty acids in the pathology of metabolic syndrome. *J Nutr Biochem* 23, 1027-1040.

Löffler, G., and Petrides, P.E. (1998). *Biochemie und Pathobiochemie.*, Auflage. edn.

Lumeng, C.N., Deyoung, S.M., Bodzin, J.L., and Saltiel, A.R. (2007). Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes* 56, 16-23.

Lundåsen, T., Hunt, M.C., Nilsson, L.M., Sanyal, S., Angelin, B., Alexson, S.E., and Rudling, M. (2007). PPARalpha is a key regulator of hepatic FGF21. *Biochem Biophys Res Commun* 360, 437-440.

López, I.P., Marti, A., Milagro, F.I., Zulet Md, M.e.L., Moreno-Aliaga, M.J., Martinez, J.A., and De Miguel, C. (2003). DNA microarray analysis of genes differentially expressed in diet-induced (cafeteria) obese rats. *Obes Res* 11, 188-194.

Ma, Y., Liu, X., Wei, Z., Wang, X., Wang, Z., Zhong, W., Li, Y., Zhu, F., Guo, C., and Zhang, L. (2013). The expression and significance of TIPE2 in peripheral blood mononuclear cells from asthmatic children. *Scand J Immunol* 78, 523-528.

Maas, K., Chan, S., Parker, J., Slater, A., Moore, J., Olsen, N., and Aune, T.M. (2002). Cutting edge: molecular portrait of human autoimmune disease. *J Immunol* 169, 5-9.

Maffei, M., Halaas, J., Ravussin, E., Pratley, R.E., Lee, G.H., Zhang, Y., Fei, H., Kim, S., Lallone, R., and Ranganathan, S. (1995). Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* 1, 1155-1161.

Mager, U., Kolehmainen, M., de Mello, V.D., Schwab, U., Laaksonen, D.E., Rauramaa, R., Gylling, H., Atalay, M., Pulkkinen, L., and Uusitupa, M. (2008). Expression of ghrelin gene in peripheral blood mononuclear cells and plasma ghrelin concentrations in patients with metabolic syndrome. *Eur J Endocrinol* 158, 499-510.

Manrique, C., Demarco, V.G., Aroor, A.R., Mugerfeld, I., Garro, M., Habibi, J., Hayden, M.R., and Sowers, J.R. (2013). Obesity and insulin resistance induce early development of diastolic dysfunction in young female mice fed a western diet. *Endocrinology*.

Masuzaki, H., Ogawa, Y., Sagawa, N., Hosoda, K., Matsumoto, T., Mise, H., Nishimura, H., Yoshimasa, Y., Tanaka, I., Mori, T., *et al.* (1997). Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med* 3, 1029-1033.

Matamala, J.C., Gianotti, M., Pericás, J., Quevedo, S., Roca, P., Palou, A., and García-Palmer, F.J. (1996). Changes induced by fasting and dietetic obesity in thermogenic parameters of rat brown adipose tissue mitochondrial subpopulations. *Biochem J* 319 (Pt 2), 529-534.

Matthews, D.R., Hosker, J.P., Rudenski, A.S., Naylor, B.A., Treacher, D.F., and Turner, R.C. (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell

function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28, 412-419.

Matthias, A., Ohlson, K.B., Fredriksson, J.M., Jacobsson, A., Nedergaard, J., and Cannon, B. (2000). Thermogenic responses in brown fat cells are fully UCP1-dependent. UCP2 or UCP3 do not substitute for UCP1 in adrenergically or fatty acid-induced thermogenesis. *J Biol Chem* 275, 25073-25081.

McDonald, R.B., and Horwitz, B.A. (1999). Brown adipose tissue thermogenesis during aging and senescence. *J Bioenerg Biomembr* 31, 507-516.

Mercader, J., Ribot, J., Murano, I., Felipe, F., Cinti, S., Bonet, M.L., and Palou, A. (2006). Remodeling of white adipose tissue after retinoic acid administration in mice. *Endocrinology* 147, 5325-5332.

Milagro, F.I., Miranda, J., Portillo, M.P., Fernandez-Quintela, A., Campión, J., and Martínez, J.A. (2013). High-throughput sequencing of microRNAs in peripheral blood mononuclear cells: identification of potential weight loss biomarkers. *PLoS One* 8, e54319.

Millward, C.A., Heaney, J.D., Sinasac, D.S., Chu, E.C., Bederman, I.R., Gilge, D.A., Previs, S.F., and Croniger, C.M. (2007). Mice with a deletion in the gene for CCAAT/enhancer-binding protein beta are protected against diet-induced obesity. *Diabetes* 56, 161-167.

Mizuno, T.M., Makimura, H., Silverstein, J., Roberts, J.L., Lopingco, T., and Mobbs, C.V. (1999). Fasting regulates hypothalamic neuropeptide Y, agouti-related peptide, and proopiomelanocortin in diabetic mice independent of changes in leptin or insulin. *Endocrinology* 140, 4551-4557.

Mohanty, P., Ghanim, H., Hamouda, W., Aljada, A., Garg, R., and Dandona, P. (2002). Both lipid and protein intakes stimulate increased generation of reactive oxygen species by polymorphonuclear leukocytes and mononuclear cells. *Am J Clin Nutr* 75, 767-772.

Morris, M.J., Chen, H., Watts, R., Shulkes, A., and Cameron-Smith, D. (2008). Brain neuropeptide Y and CCK and peripheral adipokine receptors: temporal response in obesity induced by palatable diet. *Int J Obes (Lond)* 32, 249-258.

Nadler, S.T., Stoehr, J.P., Schueler, K.L., Tanimoto, G., Yandell, B.S., and Attie, A.D. (2000). The expression of adipogenic genes is decreased in obesity and diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 11371-11376.

Napoleone, E., Di Santo, A., Amore, C., Baccante, G., di Febbo, C., Porreca, E., de Gaetano, G., Donati, M.B., and Lorenzet, R. (2007). Leptin induces tissue factor expression in human peripheral blood mononuclear cells: a possible link between obesity and cardiovascular risk? *J Thromb Haemost* 5, 1462-1468.

Neal, G.W., Solomon, S.S., Shankar, T.P., and Duckworth, W.C. (1983). Glucagon degradation by human mononuclear cells. *Diabetologia* 25, 404-410.

Nedergaard, J., Bengtsson, T., and Cannon, B. (2007). Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293, E444-452.

Nguyen, P., Leray, V., Diez, M., Serisier, S., Le Bloc'h, J., Siliart, B., and Dumon, H. (2008). Liver lipid metabolism. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 92, 272-283.

Novelli, E.L., Diniz, Y.S., Galhardi, C.M., Ebaid, G.M., Rodrigues, H.G., Mani, F., Fernandes, A.A., Cicogna, A.C., and Novelli Filho, J.L. (2007). Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab Anim* 41, 111-119.

- O'Rourke, R.W., Gaston, G.D., Meyer, K.A., White, A.E., and Marks, D.L. (2013). Adipose tissue NK cells manifest an activated phenotype in human obesity. *Metabolism* 62, 1557-1561.
- O'Rourke, R.W., Kay, T., Lyle, E.A., Traxler, S.A., Deveney, C.W., Jobe, B.A., Roberts, C.T., Marks, D., and Rosenbaum, J.T. (2006). Alterations in peripheral blood lymphocyte cytokine expression in obesity. *Clin Exp Immunol* 146, 39-46.
- Oberkofler, H., Dallinger, G., Liu, Y.M., Hell, E., Krempler, F., and Patsch, W. (1997). Uncoupling protein gene: quantification of expression levels in adipose tissues of obese and non-obese humans. *J Lipid Res* 38, 2125-2133.
- Oliver, P., Caimari, A., Díaz-Rúa, R., and Palou, A. (2012). Diet-induced obesity affects expression of adiponutrin/PNPLA3 and adipose triglyceride lipase, two members of the same family. *Int J Obes (Lond)* 36, 225-232.
- Oliver, P., Reynés, B., Caimari, A., and Palou, A. (2013). Peripheral blood mononuclear cells: a potential source of homeostatic imbalance markers associated with obesity development. *Pflugers Arch* 465, 459-468.
- Olsen, N., Sokka, T., Seehorn, C.L., Kraft, B., Maas, K., Moore, J., and Aune, T.M. (2004a). A gene expression signature for recent onset rheumatoid arthritis in peripheral blood mononuclear cells. *Ann Rheum Dis* 63, 1387-1392.
- Olsen, N.J., Moore, J.H., and Aune, T.M. (2004b). Gene expression signatures for autoimmune disease in peripheral blood mononuclear cells. *Arthritis Res Ther* 6, 120-128.
- Ong, Z.Y., Wanasuria, A.F., Lin, M.Z., Hiscock, J., and Muhlhausler, B.S. (2013). Chronic intake of a cafeteria diet and subsequent abstinence. Sex-specific effects on gene expression in the mesolimbic reward system. *Appetite* 65, 189-199.
- Palou, A. (2006). [New challenges in basic and applied nutrition]. *Rev Med Univ Navarra* 50, 62-70.
- Palou, A., and Bonet, M.L. (2013). Challenges in obesity research. *Nutr Hosp* 28 *Suppl* 5, 144-153.
- Palou, A., Picó, C., Bonet, M.L., and Oliver, P. (1998). The uncoupling protein, thermogenin. *Int J Biochem Cell Biol* 30, 7-11.
- Palou, A., Serra, F., Bonet, M.L., and Picó, C. (2000). Obesity: molecular bases of a multifactorial problem. *Eur J Nutr* 39, 127-144.
- Palou, M., Priego, T., Sánchez, J., Rodríguez, A.M., Palou, A., and Picó, C. (2009a). Gene expression patterns in visceral and subcutaneous adipose depots in rats are linked to their morphologic features. *Cell Physiol Biochem* 24, 547-556.
- Palou, M., Priego, T., Sánchez, J., Torrens, J.M., Palou, A., and Picó, C. (2010a). Moderate caloric restriction in lactating rats protects offspring against obesity and insulin resistance in later life. *Endocrinology* 151, 1030-1041.
- Palou, M., Priego, T., Sánchez, J., Villegas, E., Rodríguez, A.M., Palou, A., and Picó, C. (2008). Sequential changes in the expression of genes involved in lipid metabolism in adipose tissue and liver in response to fasting. *Pflugers Arch* 456, 825-836.
- Palou, M., Sánchez, J., Priego, T., Rodríguez, A.M., Picó, C., and Palou, A. (2010b). Regional differences in the expression of genes involved in lipid metabolism in adipose tissue in response to short- and medium-term fasting and refeeding. *J Nutr Biochem* 21, 23-33.
- Palou, M., Sánchez, J., Rodríguez, A.M., Priego, T., Picó, C., and Palou, A. (2009b). Induction of NPY/AgRP orexigenic peptide expression in rat hypothalamus is an early event in fasting: relationship with circulating leptin, insulin and glucose. *Cell Physiol Biochem* 23, 115-124.

Patel, L., Buckels, A.C., Kinghorn, I.J., Murdock, P.R., Holbrook, J.D., Plumpton, C., Macphee, C.H., and Smith, S.A. (2003). Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochem Biophys Res Commun* 300, 472-476.

Petrovic, N., Walden, T.B., Shabalina, I.G., Timmons, J.A., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2010). Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J Biol Chem* 285, 7153-7164.

Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45.

Pico, C., and Palou, A. (2013). Perinatal programming of obesity: an introduction to the topic. *Front Physiol* 4, 255.

Pico, C., Sanchez, J., Oliver, P., and Palou, A. (2002). Leptin production by the stomach is up-regulated in obese (fa/fa) Zucker rats. *Obes Res* 10, 932-938.

Pilegaard, H., Saltin, B., and Neuffer, P.D. (2003). Effect of short-term fasting and refeeding on transcriptional regulation of metabolic genes in human skeletal muscle. *Diabetes* 52, 657-662.

Powers, A.C., Solomon, S.S., and Duckworth, W.C. (1980). Insulin degradation by mononuclear cells. *Diabetes* 29, 27-32.

Priego, T., Sánchez, J., Palou, A., and Picó, C. (2009). Effect of high-fat diet feeding on leptin receptor expression in white adipose tissue in rats: depot- and sex-related differential response. *Genes Nutr* 4, 151-156.

Proenza, A.M., Lladó, I., Serra, F., Picó, C., Pons, A., and Palou, A. (1992). Tissue composition in persistent dietary obesity after early and adulthood overfeeding in the rat. *Arch Int Physiol Biochim Biophys* 100, 147-154.

Puigserver, P., Lladó, I., Palou, A., and Gianotti, M. (1991). Evidence for masking of brown adipose tissue mitochondrial GDP-binding sites in response to fasting in rats made obese by dietary manipulation. Effects of reversion to standard diet. *Biochem J* 279 (Pt 2), 575-579.

Puigserver, P., Vázquez, F., Bonet, M.L., Picó, C., and Palou, A. (1996). In vitro and in vivo induction of brown adipocyte uncoupling protein (thermogenin) by retinoic acid. *Biochem J* 317 (Pt 3), 827-833.

Radler, U., Stangl, H., Lechner, S., Lienbacher, G., Krepp, R., Zeller, E., Brachinger, M., Eller-Berndl, D., Fischer, A., Anzur, C., *et al.* (2011). A combination of (ω -3) polyunsaturated fatty acids, polyphenols and L-carnitine reduces the plasma lipid levels and increases the expression of genes involved in fatty acid oxidation in human peripheral blood mononuclear cells and HepG2 cells. *Ann Nutr Metab* 58, 133-140.

Rahman, S.M., Janssen, R.C., Choudhury, M., Baquero, K.C., Aikens, R.M., de la Houssaye, B.A., and Friedman, J.E. (2012). CCAAT/enhancer-binding protein β (C/EBP β) expression regulates dietary-induced inflammation in macrophages and adipose tissue in mice. *J Biol Chem* 287, 34349-34360.

Ramirez-Boo, M., Garrido, J.J., Ogueta, S., Calvete, J.J., Gómez-Díaz, C., and Moreno, A. (2006). Analysis of porcine peripheral blood mononuclear cells proteome by 2-DE and MS: analytical and biological variability in the protein expression level and protein identification. *Proteomics* 6 Suppl 1, S215-225.

Ratzer, R., Søndergaard, H., Christensen, J.R., Börnsen, L., Borup, R., Sørensen, P., and Sellebjerg, F. (2013). Gene expression analysis of relapsing-remitting, primary progressive and secondary progressive multiple sclerosis. *Mult Scler* 19, 1841-1848.

Reid, B.N., Ables, G.P., Otlivanchik, O.A., Schoiswohl, G., Zechner, R., Blaner, W.S., Goldberg, I.J., Schwabe, R.F., Chua, S.C., and Huang, L.S. (2008). Hepatic overexpression of hormone-sensitive lipase and adipose triglyceride lipase promotes fatty acid oxidation, stimulates direct release of free fatty acids, and ameliorates steatosis. *J Biol Chem* 283, 13087-13099.

Reynés, B., García-Ruíz, E., Díaz-Rúa, R., Palou, A., and Oliver, P. (2014). Reversion to a control balanced diet is able to restore body weight and to recover altered metabolic parameters in adult rats long-term fed on a cafeteria diet. *Food Research International* 64 10.

Ribot, J., Felipe, F., Bonet, M.L., and Palou, A. (2001). Changes of adiposity in response to vitamin A status correlate with changes of PPAR gamma 2 expression. *Obes Res* 9, 500-509.

Ribot, J., Rodríguez, A.M., Rodríguez, E., and Palou, A. (2008). Adiponectin and resistin response in the onset of obesity in male and female rats. *Obesity (Silver Spring)* 16, 723-730.

Ricquier, D. (2005). Respiration uncoupling and metabolism in the control of energy expenditure. *Proc Nutr Soc* 64, 47-52.

Ricquier, D., and Bouillaud, F. (2000). The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochem J* 345 Pt 2, 161-179.

Roca, P., Rodríguez, A.M., Oliver, P., Bonet, M.L., Quevedo, S., Picó, C., and Palou, A. (1999). Brown adipose tissue response to cafeteria diet-feeding involves induction of the UCP2 gene and is impaired in female rats as compared to males. *Pflugers Arch* 438, 628-634.

Rodríguez, A.M., and Palou, A. (2004). Uncoupling proteins: gender dependence and their relation to body weight control. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28, 500-502.

Rodríguez, A.M., Roca, P., Bonet, M.L., Picó, C., Oliver, P., and Palou, A. (2003). Positive correlation of skeletal muscle UCP3 mRNA levels with overweight in male, but not in female, rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285, R880-888.

Rodríguez, E., Ribot, J., Rodríguez, A.M., and Palou, A. (2004). PPAR-gamma2 expression in response to cafeteria diet: gender- and depot-specific effects. *Obes Res* 12, 1455-1463.

Rogers, P.J. (1985). Returning 'cafeteria-fed' rats to a chow diet: negative contrast and effects of obesity on feeding behaviour. *Physiol Behav* 35, 493-499.

Rolls, B.J., Rowe, E.A., and Turner, R.C. (1980). Persistent obesity in rats following a period of consumption of a mixed, high energy diet. *J Physiol* 298, 415-427.

Roman, S., Agil, A., Peran, M., Alvaro-Galue, E., Ruiz-Ojeda, F.J., and Marchal, J.A. (2014). Brown adipose tissue and novel therapeutic approaches to treat metabolic disorders. *Transl Res*.

Rosen, E.D., and Spiegelman, B.M. (2014). What we talk about when we talk about fat. *Cell* 156, 20-44.

Roth, G.S., Tzankoff, S.P., and Elahi, D. (1981). Effects of age on control of lipolysis during fasting. *J Gerontol* 36, 391-397.

Rothwell, N.J., and Stock, M.J. (1979). A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Nature* 281, 31-35.

Rudkowska, I., Ponton, A., Jacques, H., Lavigne, C., Holub, B.J., Marette, A., and Vohl, M.C. (2011). Effects of a supplementation of n-3 polyunsaturated fatty acids with or without fish gelatin on gene expression in peripheral blood mononuclear cells in obese, insulin-resistant subjects. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 4, 192-202.

Ryden, M., Dicker, A., van Harmelen, V., Hauner, H., Brunnberg, M., Perbeck, L., Lonnqvist, F., and Arner, P. (2002). Mapping of early signaling events in tumor necrosis factor-alpha-mediated lipolysis in human fat cells. *J Biol Chem* 277, 1085-1091.

Rydén, M., Arvidsson, E., Blomqvist, L., Perbeck, L., Dicker, A., and Arner, P. (2004). Targets for TNF-alpha-induced lipolysis in human adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 318, 168-175.

Sachithanandan, N., Fam, B.C., Fynch, S., Dzamko, N., Watt, M.J., Wormald, S., Honeyman, J., Galic, S., Proietto, J., Andrikopoulos, S., *et al.* (2010). Liver-specific suppressor of cytokine signaling-3 deletion in mice enhances hepatic insulin sensitivity and lipogenesis resulting in fatty liver and obesity. *Hepatology* 52, 1632-1642.

Sahu, A. (2004). Minireview: A hypothalamic role in energy balance with special emphasis on leptin. *Endocrinology* 145, 2613-2620.

Saito, M. (2013). Brown adipose tissue as a regulator of energy expenditure and body fat in humans. *Diabetes Metab J* 37, 22-29.

Saito, M., Okamatsu-Ogura, Y., Matsushita, M., Watanabe, K., Yoneshiro, T., Nio-Kobayashi, J., Iwanaga, T., Miyagawa, M., Kameya, T., Nakada, K., *et al.* (2009). High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes* 58, 1526-1531.

Sala, G., Stefanoni, G., Arosio, A., Riva, C., Melchionda, L., Saracchi, E., Fermi, S., Brighina, L., and Ferrarese, C. (2014). Reduced expression of the chaperone-mediated autophagy carrier hsc70 protein in lymphomonocytes of patients with Parkinson's disease. *Brain Res* 1546, 46-52.

Samara, A., Marie, B., Pfister, M., and Visvikis-Siest, S. (2008). Leptin expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) is related with blood pressure variability. *Clin Chim Acta* 395, 47-50.

Sampey, B.P., Vanhoose, A.M., Winfield, H.M., Freerman, A.J., Muehlbauer, M.J., Fueger, P.T., Newgard, C.B., and Makowski, L. (2011a). Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity (Silver Spring)* 19, 1109-1117.

Santos-Alvarez, J., Goberna, R., and Sánchez-Margalet, V. (1999). Human leptin stimulates proliferation and activation of human circulating monocytes. *Cell Immunol* 194, 6-11.

Satoh-Asahara, N., Shimatsu, A., Sasaki, Y., Nakaoka, H., Himeno, A., Tochiya, M., Kono, S., Takaya, T., Ono, K., Wada, H., *et al.* (2012). Highly purified eicosapentaenoic acid increases interleukin-10 levels of peripheral blood monocytes in obese patients with dyslipidemia. *Diabetes Care* 35, 2631-2639.

Schrauwen, P., and Westerterp, K.R. (2000). The role of high-fat diets and physical activity in the regulation of body weight. *Br J Nutr* 84, 417-427.

Schulz, M., Dotzlaw, H., Mikkat, S., Eggert, M., and Neeck, G. (2007). Proteomic analysis of peripheral blood mononuclear cells: selective protein processing observed in patients with rheumatoid arthritis. *J Proteome Res* 6, 3752-3759.

Schwarz, J.M., Linfoot, P., Dare, D., and Aghajanian, K. (2003). Hepatic de novo lipogenesis in normoinsulinemic and hyperinsulinemic subjects consuming high-fat, low-carbohydrate and low-fat, high-carbohydrate isoenergetic diets. *Am J Clin Nutr* 77, 43-50.

Sclafani, A., and Springer, D. (1976). Dietary obesity in adult rats: similarities to hypothalamic and human obesity syndromes. *Physiol Behav* 17, 461-471.

Scoaris, C.R., Rizo, G.V., Roldi, L.P., de Moraes, S.M., de Proença, A.R., Peralta, R.M., and Natali, M.R. (2010). Effects of cafeteria diet on the jejunum in sedentary and physically trained rats. *Nutrition* 26, 312-320.

Seale, P., Bjork, B., Yang, W., Kajimura, S., Chin, S., Kuang, S., Scimè, A., Devarakonda, S., Conroe, H.M., Erdjument-Bromage, H., *et al.* (2008). PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* 454, 961-967.

Seale, P., Conroe, H.M., Estall, J., Kajimura, S., Frontini, A., Ishibashi, J., Cohen, P., Cinti, S., and Spiegelman, B.M. (2011). Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *J Clin Invest* 121, 96-105.

Seale, P., Kajimura, S., Yang, W., Chin, S., Rohas, L.M., Uldry, M., Tavernier, G., Langin, D., and Spiegelman, B.M. (2007). Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. *Cell Metab* 6, 38-54.

Sharp, L.Z., Shinoda, K., Ohno, H., Scheel, D.W., Tomoda, E., Ruiz, L., Hu, H., Wang, L., Pavlova, Z., Gilsanz, V., *et al.* (2012). Human BAT possesses molecular signatures that resemble beige/brite cells. *PLoS One* 7, e49452.

Sherwin, R.S. (1980). Role of the liver in glucose homeostasis. *Diabetes Care* 3, 261-265.

Shimizu, T., and Yokotani, K. (2009). Acute cold exposure-induced down-regulation of CIDEA, cell death-inducing DNA fragmentation factor-alpha-like effector A, in rat interscapular brown adipose tissue by sympathetically activated beta3-adrenoreceptors. *Biochem Biophys Res Commun* 387, 294-299.

South, T., Westbrook, F., and Morris, M.J. (2012). Neurological and stress related effects of shifting obese rats from a palatable diet to chow and lean rats from chow to a palatable diet. *Physiol Behav* 105, 1052-1057.

Speakman, J.R., and Keijer, J. (2012). Not so hot: Optimal housing temperatures for mice to mimic the thermal environment of humans. *Mol Metab* 2, 5-9.

Steppan, C.M., Bailey, S.T., Bhat, S., Brown, E.J., Banerjee, R.R., Wright, C.M., Patel, H.R., Ahima, R.S., and Lazar, M.A. (2001). The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409, 307-312.

Stevens, J., Green, M.H., Kaiser, D.L., and Pohl, S.L. (1981). Insulin resistance in adipocytes from fed and fasted obese rats: dissociation of two insulin actions. *Mol Cell Biochem* 37, 177-183.

Ström, K., Gundersen, T.E., Hansson, O., Lucas, S., Fernandez, C., Blomhoff, R., and Holm, C. (2009). Hormone-sensitive lipase (HSL) is also a retinyl ester hydrolase: evidence from mice lacking HSL. *FASEB J* 23, 2307-2316.

Sánchez, J., Priego, T., Palou, M., Tobaruela, A., Palou, A., and Picó, C. (2008). Oral supplementation with physiological doses of leptin during lactation in rats improves insulin sensitivity and affects food preferences later in life. *Endocrinology* 149, 733-740.

Sánchez, J., Priego, T., Picó, C., Ahrens, W., De Henauw, S., Fraterman, A., Mårild, S., Molnár, D., Moreno, L.A., Peplies, J., *et al.* (2012). Blood cells as a source of transcriptional biomarkers of childhood obesity and its related metabolic alterations: results of the IDEFICS study. *J Clin Endocrinol Metab* 97, E648-652.

Sánchez-Margalet, V., Martín-Romero, C., Santos-Alvarez, J., Goberna, R., Najib, S., and Gonzalez-Yanes, C. (2003). Role of leptin as an immunomodulator of blood mononuclear cells: mechanisms of action. *Clin Exp Immunol* 133, 11-19.

Todorova, V.K., Beggs, M.L., Delongchamp, R.R., Dhakal, I., Makhoul, I., Wei, J.Y., and Klimberg, V.S. (2012). Transcriptome profiling of peripheral blood cells

identifies potential biomarkers for doxorubicin cardiotoxicity in a rat model. *PLoS One* 7, e48398.

Tontonoz, P., Hu, E., and Spiegelman, B.M. (1995). Regulation of adipocyte gene expression and differentiation by peroxisome proliferator activated receptor gamma. *Curr Opin Genet Dev* 5, 571-576.

Tsiotra, P.C., Pappa, V., Raptis, S.A., and Tsigos, C. (2000). Expression of the long and short leptin receptor isoforms in peripheral blood mononuclear cells: implications for leptin's actions. *Metabolism* 49, 1537-1541.

Tsiotra, P.C., Tsigos, C., Anastasiou, E., Yfanti, E., Boutati, E., Souvatzoglou, E., Kyrou, I., and Raptis, S.A. (2008). Peripheral mononuclear cell resistin mRNA expression is increased in type 2 diabetic women. *Mediators Inflamm* 2008, 892864.

Tsiotra, P.C., Tsigos, C., Yfanti, E., Anastasiou, E., Vikentiou, M., Psarra, K., Papasteriades, C., and Raptis, S.A. (2007). Visfatin, TNF-alpha and IL-6 mRNA expression is increased in mononuclear cells from type 2 diabetic women. *Horm Metab Res* 39, 758-763.

van Erk, M.J., Blom, W.A., van Ommen, B., and Hendriks, H.F. (2006). High-protein and high-carbohydrate breakfasts differentially change the transcriptome of human blood cells. *Am J Clin Nutr* 84, 1233-1241.

van Erk, M.J., Wopereis, S., Rubingh, C., van Vliet, T., Verheij, E., Cnubben, N.H., Pedersen, T.L., Newman, J.W., Smilde, A.K., van der Greef, J., *et al.* (2010). Insight in modulation of inflammation in response to diclofenac intervention: a human intervention study. *BMC Med Genomics* 3, 5.

Varela, L.M., Ortega, A., Bermudez, B., Lopez, S., Pacheco, Y.M., Villar, J., Abia, R., and Muriana, F.J. (2011). A high-fat meal promotes lipid-load and apolipoprotein B-48 receptor transcriptional activity in circulating monocytes. *Am J Clin Nutr* 93, 918-925.

Vedin, I., Cederholm, T., Freund-Levi, Y., Basun, H., Garlind, A., Irving, G.F., Eriksdotter-Jönhagen, M., Wahlund, L.O., Dahlman, I., and Palmblad, J. (2012). Effects of DHA-rich n-3 fatty acid supplementation on gene expression in blood mononuclear leukocytes: the OmegAD study. *PLoS One* 7, e35425.

Velloso, L.A., and Schwartz, M.W. (2011). Altered hypothalamic function in diet-induced obesity. *Int J Obes (Lond)* 35, 1455-1465.

Vial, G., Dubouchaud, H., Couturier, K., Cottet-Rousselle, C., Taleux, N., Athias, A., Galinier, A., Casteilla, L., and Leverve, X.M. (2011). Effects of a high-fat diet on energy metabolism and ROS production in rat liver. *J Hepatol* 54, 348-356.

Vidal-Puig, A., Jimenez-Liñan, M., Lowell, B.B., Hamann, A., Hu, E., Spiegelman, B., Flier, J.S., and Moller, D.E. (1996). Regulation of PPAR gamma gene expression by nutrition and obesity in rodents. *J Clin Invest* 97, 2553-2561.

Visvikis-Siest, S., Marteau, J.B., Samara, A., Berrahmoune, H., Marie, B., and Pfister, M. (2007). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs): a possible model for studying cardiovascular biology systems. *Clin Chem Lab Med* 45, 1154-1168.

Waldén, T.B., Hansen, I.R., Timmons, J.A., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2012). Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, "brite," and white adipose tissues. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302, E19-31.

Wang, J., Liu, R., Hawkins, M., Barzilai, N., and Rossetti, L. (1998). A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature* 393, 684-688.

Wang, J., Tang, H., Zhang, C., Zhao, Y., Derrien, M., Rocher, E., van-Hylckama Vlieg, J.E., Strissel, K., Zhao, L., Obin, M., *et al.* (2014). Modulation of gut

microbiota during probiotic-mediated attenuation of metabolic syndrome in high fat diet-fed mice. *ISME J*.

Wang, Q.A., Tao, C., Gupta, R.K., and Scherer, P.E. (2013). Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nat Med* *19*, 1338-1344.

Webber, J. (2003). Energy balance in obesity. *Proc Nutr Soc* *62*, 539-543.

Whittle, A.J., López, M., and Vidal-Puig, A. (2011). Using brown adipose tissue to treat obesity - the central issue. *Trends Mol Med* *17*, 405-411.

Woo, Y.C., Xu, A., Wang, Y., and Lam, K.S. (2013). Fibroblast growth factor 21 as an emerging metabolic regulator: clinical perspectives. *Clin Endocrinol (Oxf)* *78*, 489-496.

Wright, S.M., and Aronne, L.J. (2012). Causes of obesity. *Abdom Imaging* *37*, 730-732.

Wu, J., Boström, P., Sparks, L.M., Ye, L., Choi, J.H., Giang, A.H., Khandekar, M., Virtanen, K.A., Nuutila, P., Schaart, G., *et al.* (2012). Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* *150*, 366-376.

Wu, J., Cohen, P., and Spiegelman, B.M. (2013). Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown? *Genes Dev* *27*, 234-250.

Wu, Q., Kazantzis, M., Doege, H., Ortegon, A.M., Tsang, B., Falcon, A., and Stahl, A. (2006). Fatty acid transport protein 1 is required for nonshivering thermogenesis in brown adipose tissue. *Diabetes* *55*, 3229-3237.

Xu, H., Barnes, G.T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C.J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J.S., Tartaglia, L.A., *et al.* (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* *112*, 1821-1830.

Xue, B., Coulter, A., Rim, J.S., Koza, R.A., and Kozak, L.P. (2005). Transcriptional synergy and the regulation of *Ucp1* during brown adipocyte induction in white fat depots. *Mol Cell Biol* *25*, 8311-8322.

Yamashita, H., Yamamoto, M., Ookawara, T., Sato, Y., Ueno, N., and Ohno, H. (1994). Discordance between thermogenic activity and expression of uncoupling protein in brown adipose tissue of old rats. *J Gerontol* *49*, B54-59.

Younossi, Z.M., Stepanova, M., Afendy, M., Fang, Y., Younossi, Y., Mir, H., and Srishord, M. (2011). Changes in the prevalence of the most common causes of chronic liver diseases in the United States from 1988 to 2008. *Clin Gastroenterol Hepatol* *9*, 524-530.e521; quiz e560.

Yu, B.P., Bertrand, H.A., and Masoro, E.J. (1980). Nutrition-aging influence of catecholamine-promoted lipolysis. *Metabolism* *29*, 438-444.

Yu, J.H., and Kim, M.S. (2012). Molecular mechanisms of appetite regulation. *Diabetes Metab J* *36*, 391-398.

Zang, Y., Wang, T., Xie, W., Wang-Fischer, Y.L., Getty, L., Han, J., Corkey, B.E., and Guo, W. (2005). Regulation of acetyl CoA carboxylase and carnitine palmitoyl transferase-1 in rat adipocytes. *Obes Res* *13*, 1530-1539.

Zechner, R., Kienesberger, P.C., Haemmerle, G., Zimmermann, R., and Lass, A. (2009). Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. *J Lipid Res* *50*, 3-21.

Zeng, X.L., Zhang, S.Y., Zheng, J.F., Yuan, H., and Wang, Y. (2013). Altered miR-143 and miR-150 expressions in peripheral blood mononuclear cells for diagnosis of non-small cell lung cancer. *Chin Med J (Engl)* *126*, 4510-4516.

Zhao, M., Lamers, Y., Ralat, M.A., Coats, B.S., Chi, Y.Y., Muller, K.E., Bain, J.R., Shankar, M.N., Newgard, C.B., Stacpoole, P.W., *et al.* (2012). Marginal vitamin

B-6 deficiency decreases plasma (n-3) and (n-6) PUFA concentrations in healthy men and women. *J Nutr* 142, 1791-1797.

Zimmermann, R., Strauss, J.G., Haemmerle, G., Schoiswohl, G., Birner-Gruenberger, R., Riederer, M., Lass, A., Neuberger, G., Eisenhaber, F., Hermetter, A., *et al.* (2004). Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* 306, 1383-1386.