



CARACTERIZACIÓN DEL PAPEL DEL SUCCINATO Y SU RECEPTOR SUCNR1 EN LA FISIOPATOLOGIA DE LA OBESIDAD Y LA DIABETES DE TIPO 2

Noelia Keiran Fernández

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

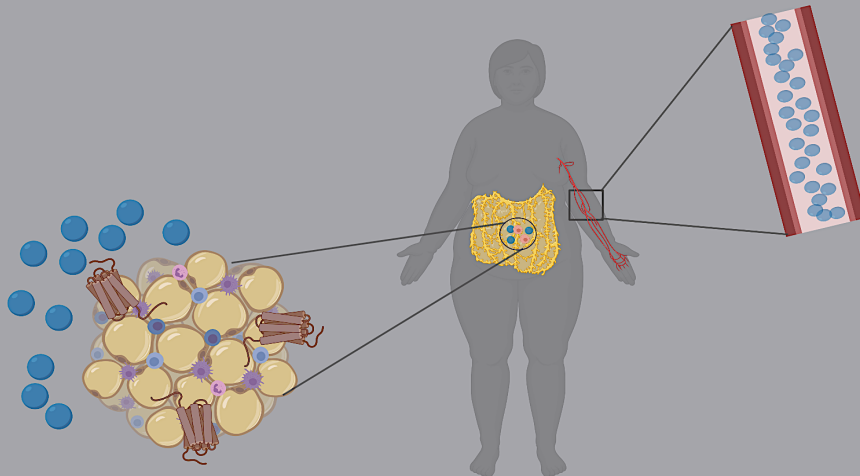
WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI

Caracterización del papel del succinato y su receptor SUCNR1 en la fisiopatología de la obesidad y la diabetes de tipo 2

NOELIA KEIRAN FERNÁNDEZ



TESIS DOCTORAL

2021

Noelia Keiran Fernández

**Caracterización del papel del succinato y su receptor
SUCNR1 en la fisiopatología de la obesidad y la
diabetes de tipo 2**

TESIS DOCTORAL

Dirigida por

Dra. Sonia Fernández Veleo y Dr. Joan Vendrell Ortega



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona 2021



UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI

Sonia Fernández Veledo, Dra. en Biomedicina por la Universidad de Barcelona, Investigadora senior del Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV) y Profesora Asociada de la URV, y Joan Vendrell, Dr. en Medicina y Cirugía por la Universidad de Barcelona, especialista en Endocrinología y Nutrición, Director del IISPV y Catedrático de la URV; Ambos Co-directores del Grupo de Investigación en Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas del IISPV.

CERTIFICAN QUE:

La tesis doctoral "**Caracterización del papel del succinato y su receptor SUCNR1 en la fisiopatología de la obesidad y la diabetes de tipo 2**", presentada por Noelia Keiran Fernández, ha sido realizada bajo nuestra dirección y cumple con los requisitos necesarios para optar al título de Doctor.

Y para que así conste y tenga los efectos oportunos, firmamos el presente documento en Tarragona, a 18 de mayo de 2021.

SONIA
FERNANDEZ
VELEDO - DNI
53064774W

Firmado digitalmente por SONIA FERNANDEZ VELEDO - DNI 53064774W
Fecha: 2021.05.18 08:58:36 +02'00'

Fdo. Dra. Sonia Fernández Veledo

39663032S
JUAN JOSE
VENDRELL (R:
G43814045)

Firmado digitalmente por 39663032S JUAN JOSE VENDRELL (R: G43814045)
Fecha: 2021.05.18 09:06:25 +02'00'

Fdo. Dr. Joan Vendrell

AGRADECIMIENTOS

Este apartado es muy importante para mí, ya que me permite reconocer y agradecer el gran esfuerzo y trabajo de todas las personas que han formado parte de este largo camino y que por supuesto a ellas debo el orgullo y el honor de poder presentar hoy esta tesis doctoral.

En primer lugar, agradecer enormemente a mi directora de tesis y mentora, la Dra. Sonia Fernández Veledo, quien me acogió en su grupo hace ya 8 años, cuando apenas era una estudiante de grado con curiosidad e interés por comprender más sobre el mundo de la investigación. Gracias por formarme, por enseñarme a tener una visión crítica e integradora de las cosas, y sobre todo gracias por la confianza depositada en mí.

También agradecer a mi director de tesis, el Dr. Joan Vendrell, por dar soporte en mi formación desde un punto de vista clínico, ayudándome a comprender la relevancia y el impacto de la investigación básica en la práctica clínica y dándole un sentido pragmático a esta laboriosa tarea que es la investigación.

A mis compañeros de laboratorio, por su brillante trabajo, su gran implicación y su compañerismo durante todos estos años, decir que para mí ha sido un placer trabajar con ellos, y que de cada uno me llevaré un aprendizaje diferente, con nuestros más y nuestros menos como cabría esperar, pero con una gran satisfacción en general. Especialmente a Cati por su incondicional ayuda y su compañerismo, a Enrique que ha sido un gran compañero y profesor en nuestras jornadas de estabulario, a Elsa por su visión pragmática y sus consejos en el laboratorio, a Mar por ser un gran soporte en el estabulario, a Vicky por su trabajo y colaboración durante estos años. Agradecer también a Carol por su ayuda y seguimiento durante mi primera etapa de doctorado, a Miriam por su participación y capacidad resolutive, y también a Ana y Brenno, por su entusiasmo y profesionalidad. Por último, decir gracias a mis compis doctorandos: Fran, Ester, Joan y Marga por su compañerismo y dedicación, y

por la amistad de estos años que sé que hoy me puedo llevar conmigo; así como a Teresa y Diandra, con quienes he tenido la suerte de coincidir durante este último tiempo y a las que tengo gran aprecio.

A mi familia, especialmente a mis padres por ser las personas más luchadoras que conozco, por inculcarme el valor de la honestidad y la perseverancia y por ser un gran apoyo y ejemplo en mi vida. A mi hermano, por ser mi confidente y por creer en mí siempre. A mis abuelos, por su tiempo y sus enseñanzas y porque estarían muy orgullosos de verme. A mi mejor amiga Julieta, por sus consejos y por compartir conmigo esta experiencia de ser estudiante de doctorado. Y a Iván, por ser mi compañero, darme apoyo y ser mi equilibrio en los momentos en que lo necesito.

Gracias a todos por proporcionarme guía, apoyo e inspiración para recorrer este largo camino, que en realidad no ha hecho más que empezar...

“Cualquier destino, por largo y complicado que sea, consta en realidad de un solo momento: el momento en que el hombre sabe para siempre quién es.”

Jorge Luis Borges

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	19
RESUMEN.....	23
INTRODUCCIÓN.....	27
1. Obesidad.....	29
1.1. Fisiopatología de la obesidad.....	30
1.2. Obesidad, resistencia a la insulina y T2D.....	31
1.3. Tratamientos de la obesidad.....	32
2. Órgano adiposo.....	37
2.1. Tipos de tejido adiposo.....	37
2.2. Tejido adiposo blanco.....	38
2.2.1. Capacidad expansiva del tejido adiposo blanco.....	39
2.2.2. Tipos de tejido adiposo blanco.....	40
2.2.3. Tejido adiposo blanco como órgano endocrino.....	41
2.2.4. Células del tejido adiposo blanco.....	43
2.3. Macrófago de tejido adiposo.....	45
2.3.1. Papel del macrófago en el WAT.....	46
2.3.2. Plasticidad del macrófago.....	47
2.3.3. Macrófago e inmunometabolismo.....	49
3. Succinato y SUCNR1.....	51
3.1. Succinato como sustrato energético.....	51
3.2. Succinato como molécula de señalización.....	52
3.3. SUCNR1.....	56

3.3.1. Mecanismos de señalización.....	58
3.3.2. SUCNR1 e inflamación.....	61
3.3.3. SUCNR1 en el metabolismo.....	62
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	69
RESULTADOS.....	75
DISCUSIÓN.....	103
1. Succinato-SUCNR1 como eje clave en la modulación de Procesos inflamatorios.....	106
2. Succinato circulante como biomarcador del estado metabólico.....	113
CONCLUSIONES.....	119
BIBLIOGRAFÍA.....	123

ABREVIATURAS

α KG: α -cetoglutarato, del inglés *α -ketoglutarate*.

α -KGDH: α -cetoglutarato deshidrogenasa, del inglés *α -ketoglutarate dehydrogenase*.

AC: adenilato ciclasa.

AEMPS: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios.

AMPc: adenosín monofosfato cíclico.

ASCs: células madre mesenquimales, del inglés *adipose derived stem cells*.

ATMs: macrófagos de tejido adiposo, del inglés *adipose tissue macrophages*.

BAT: tejido adiposo marrón o pardo, del inglés *brown adipose tissue*.

BMDMs: macrófagos derivados de médula ósea, del inglés *Bone marrow derived macrophages*.

BMI: índice de masa corporal, del inglés *body mass index*.

BMPs: proteínas morfogénicas del hueso, del inglés *bone morphogenetic proteins*.

Brite: tejido adiposo Beige, del inglés *brown in white*.

CLS: estructuras en forma de corona, del inglés *crown-like structures*.

CREB: elemento modulador de respuesta a AMPc, del inglés *cAMP response element-binding*.

CV: cardiovascular.

DAG: diacilglicerol.

DCs: células dendríticas, del inglés *dendritic cells*.

ECLs: bucles extracelulares, del inglés *extracellular loops*.

EC₅₀: concentración media efectiva.

FA: ácidos grasos, del inglés *fatty acids*.

FFA: ácidos grasos libres, del inglés *free fatty acids*.

FGF-21: factor de crecimiento fibroblástico 21, del inglés *fibroblast growth factor-21*.

GABA: ácido γ -aminobutírico, del inglés *γ -aminobutyric acid*.

GDH: glutamato deshidrogenasa.

GDP: guanosina difosfato, del inglés *guanosine diphosphate*.

GLP-1: péptido similar al glucagón tipo 1, del inglés *glucagon like peptide 1*.

GNI: gluconeogénesis intestinal.

GPR91: receptor de succinato, del inglés *G-protein-coupled receptor 91*.

GPCRs: receptores acoplados a proteínas G, del inglés *G-protein-coupled receptors*.

GTP: guanosina trifosfato, del inglés *guanosine triphosphate*.

HbA1c: hemoglobina glicosilada.

HIF1 α : factor 1 α inducible por hipoxia, del inglés *hypoxia inducible factor*.

HPCs: progenitores hematopoyéticos humanos, del inglés *human hematopoietic progenitor cells*.

HTA: hipertensión arterial.

ICLs: bucles intracelulares, del inglés *intracellular loops*.

IFN- γ : interferón- γ .

IKK: quinasa I κ B, del inglés *I κ B kinase*.

IL1RA: antagonista del receptor de IL1, del inglés *interleukin-1 receptor antagonist*.

IL-1: interleuquina 1.

IL-4: interleuquina 4.

IL-6: interleuquina 6.

IL-10: interleuquina 10.

IL-13: interleuquina 13.

ILC2s: células linfoides innatas tipo 2, del inglés *type 2 innate lymphoid cells*.

iNKT: células T NK invariantes, del inglés *invariant natural killer T cells*.

IP₃: inositol trifosfato, del inglés *inositol 1,4,5-trisphosphate*.

IR: resistencia a insulina, del inglés *insulin resistance*.

IRS-1: sustratos del receptor de insulina, del inglés *insulin receptor substrate 1*.

JGA: aparato yuxtaglomerular, del inglés *juxtaglomerular apparatus*.

JNK1: quinasa aminoterminal c-Jun 1, del inglés *c-Jun N-terminal kinase 1*.

KLF4: el factor 4 kruppel like, del inglés *kruppel like factor 4*.

KO: noqueado, del inglés *knockout*.

LEPR: receptor de leptina, del inglés *leptin receptor*.

LGCP: gastroplastia plicada, del inglés *laparoscopic greater curvature plication*.

Linfocitos NK: linfocitos asesinos naturales, del inglés *natural killer*.

LPS: lipolisacáridos.

MAFLD: enfermedad del hígado graso asociada a la disfunción metabólica, del inglés *metabolic associated fatty liver disease*.

MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos 1, del inglés *monocyte chemotactic protein-1*.

MCTs: transportadores monocarboxílicos, del inglés *monocarboxylate transporters*.

NAD⁺: nicotinamida adenina.

NaDC: cotransportador de Na⁺/dicarboxilato.

NF- κ B: factor nuclear kappa beta, del inglés *nuclear factor κ B*.

NO: óxido nítrico, del inglés *nitric oxid*.

OAA: oxalacetato.

OAT: transportadores dicarboxílicos de aniones orgánicos, del inglés *organic anionic transporter*.

OXPHOS: fosforilación oxidativa, del inglés *oxidative phosphorylation*.

P2Y1R: purinoreceptor 1.

PI3K: fosfatidil inositol 3 kinasa.

PKA: proteína quinasa A, del inglés *protein kinase A*.

PKB: proteína quinasa B.

PLC: fosfolipasa C, del inglés *phospholipase-C*.

PPAR γ : receptor de peroxisoma proliferador-activado gamma, del inglés *peroxisome proliferator activated receptors γ* .

RAS: sistema renina-angiotensina, del inglés, *renin angiotensin system*.

RBP4: proteína transportadora de retinol tipo 4, del inglés *retinol-binding protein 4*.

RL: radicales libres.

ROS: especies reactivas de oxígeno, del inglés *reactive oxygen species*.

RYGB: bypass gástrico en Y de Roux, del inglés *Roux-en-y gastric bypass*.

SAOS: síndrome de apnea obstructiva del sueño.

SCFA: ácidos grasos de cadena corta, del inglés *short chain fatty acids*.

scWAT: tejido adiposo subcutáneo, del inglés *subcutaneous white adipose tissue*.

SDH: succinato deshidrogenasa.

SG: gastrectomía en manga, del inglés *sleeve gastrectomy*.

siRNA: ARN pequeño de interferencia, del inglés *small interfering RNA*.

SLC13: transportador dicarboxílico, del inglés, *solute carrier family 13*.

SLC25A10: transportador dicarboxílico, del inglés, *solute carrier family 25 membrane 10*.

SNC: sistema nervioso central.

SNPs: polimorfismo de un único nucleótido, del inglés *single nucleotide polymorphism*.

SNS: Sistema Nacional de Salud.

STAT6: transductor de señal activador de la transcripción 6, del inglés *signal transducer and activator of transcription*.

SUCNR1: receptor de succinato, del inglés *succinate receptor 1*.

SVF: fracción estroma vascular, del inglés *stromal vascular fraction*.

TA: tejido adiposo.

T2D: diabetes mellitus tipo 2, del inglés *type 2 diabetes*.

TCA: ciclo de los ácidos tricarbónicos, del inglés *tricarboxylic acid cycle*.

TG: triglicéridos.

TGF- β : factor de crecimiento transformante β , del inglés *transforming growth factor β* .

Th2: linfocitos T colaboradores tipo 2, del inglés *T helper type 2*.

TLR: receptores tipo toll, del inglés *toll-like receptor*.

TMD: dominios transmembrana, del inglés *transmembrane domain*.

TNF α : factor de necrosis tumoral α , del inglés *tumor necrosis factor α* .

Treg: células T reguladoras.

UCP1: proteína desacopladora tipo 1, del inglés *uncoupling protein 1*.

VDAC: canales de aniones dependientes de voltaje, del inglés *voltage-dependent anion channel*.

VEGFs: factor de crecimiento vascular, del inglés *vascular endothelial growth factor*.

vWAT: tejido adiposo visceral, del inglés *visceral white adipose tissue*.

WAT: tejido adiposo blanco, del inglés *white adipose tissue*.

WHO: Organización Mundial de la Salud, del inglés *World Health Organization*.

RESUMEN

En los últimos años, el eje succinato-SUCNR1 ha cobrado especial interés por su demostrada implicación en diversas patologías inflamatorias crónicas, incluyendo enfermedades de tipo metabólicas como la obesidad y la diabetes de tipo (T2D). Diversos estudios han demostrado que en condiciones de estrés oxidativo la alteración en el funcionamiento del TCA conduce a la liberación de succinato de la mitocondria al citosol, y posteriormente al medio extracelular. El aumento de los niveles circulantes de succinato permite la activación específica de su receptor SUCNR1, un miembro de la familia de GPCRs. Por lo que, además de su papel como metabolito energético, participa como molécula señalizadora en diversos procesos a nivel de la célula. Entre las funciones descritas para el succinato se encuentra la activación de la respuesta inmune, motivo por el que durante mucho tiempo se le había considerado como un mero mediador de la inflamación. Además, varios estudios relacionaron niveles elevados de succinato con condiciones que constituyen un factor de riesgo en el desarrollo de enfermedad cardiovascular, como la HTA, la enfermedad cardíaca isquémica y la T2D. En este contexto, la hipótesis de esta tesis doctoral se basa en que la vía succinato-SUCNR1 en el macrófago podría contribuir de forma relevante en el desarrollo de la fisiopatología de la obesidad y la T2D, como mecanismo implicado en la respuesta metabólica inflamatoria subyacente. Además, proponemos los niveles circulantes de succinato como biomarcador indicativo del estado metabólico del paciente, y como herramienta clínica valiosa en el manejo de la obesidad y la diabetes tipo 2. Para ello, generamos un modelo de ratón *knockout* específico del receptor SUCNR1 en la línea mieloide, que nos permitiera estudiar el papel del eje succinato-SUCNR1 en el macrófago y su impacto a nivel metabólico. Por otro lado, empleamos una cohorte compuesta de 45 pacientes obesos y diabéticos tipo 2, en un estudio prospectivo aleatorizado unicentro, en el que determinamos niveles de succinato, y parámetros bioquímicos y antropométricos, previos a someterse a cirugía bariátrica y al cabo de un año, datos que fueron validados en una segunda cohorte independiente. Los resultados de nuestro estudio revelan que la vía

Resumen

succinato-SUCNR1 resulta fundamental para la adecuada respuesta de los procesos inflamatorios agudos y crónicos del organismo, así como en el curso natural de su resolución; pone en evidencia la importancia de este eje como factor determinante para el mantenimiento y funcionalidad de los macrófagos; y demuestra que la obesidad se asocia a niveles elevados de succinato, pero a una resistencia a sus efectos antiinflamatorios. Además, pone de manifiesto el enorme potencial de esta ruta desde un punto de vista traslacional en el contexto de enfermedades metabólicas, desde el punto de vista del empleo de los niveles de succinato como biomarcador del estado metabólico, aplicable en el manejo y pronóstico de la patología metabólica.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. OBESIDAD

Según la Organización Mundial de la Salud (WHO, del inglés *World Health Organization*), la obesidad se define como un desorden caracterizado por un incremento desmesurado o anormal de grasa corporal que representa un riesgo para la salud y que se produce como resultado de un desbalance entre el gasto y el aporte energético, en favor de este último. Aunque durante mucho tiempo el sobrepeso y la obesidad ha prevalecido en países desarrollados, la tasa de personas obesas en países en desarrollo está alcanzando valores similares, siendo peores las secuelas en estos últimos debido a la falta de recursos. Según la WHO, se estima que el 39% de los adultos de más de 18 años presentan sobrepeso y alrededor de un 13% de la población mundial adulta es obesa. En niños también se ha producido un incremento espectacular en los índices de obesidad a nivel mundial, pasando de un 4% en 1975 a más de un 18% en 2016¹. Dada esta elevada prevalencia a nivel mundial y a la perspectiva de aumento en los próximos años, la obesidad es considerada a día de hoy como la pandemia del siglo XXI¹.

La obesidad se relaciona con una elevada morbi-mortalidad para el individuo siendo uno de los principales factores de riesgo involucrados en el desarrollo de enfermedades crónicas como la diabetes mellitus tipo 2 (T2D, del inglés *type 2 diabetes*), el síndrome metabólico, la enfermedad cardiovascular (CV) y la enfermedad del hígado graso asociada a la disfunción metabólica (MAFLD, del inglés *metabolic associated fatty liver disease*)². Además, incrementa el riesgo de sufrir enfermedad neurodegenerativa y cáncer³, así como también la mortalidad frente a la infección por SARS-CoV-2 responsable de la covid19⁴. Es por lo tanto, uno de los principales problemas de salud pública debido al impacto que tiene en la calidad de vida de los individuos y al importante coste sanitario que comporta.

La obesidad en adultos se clasifica en base al cálculo del índice de masa corporal (BMI, del inglés *body mass index*). Este índice se obtiene a partir de la ratio entre el peso corporal en kg y la altura en m². De esta forma, la WHO define el sobrepeso como un BMI igual o superior a 25 kg/m², y la obesidad como un BMI igual o superior a 30 kg/m². A su vez, dentro de la categoría de obesidad, podemos subdividir a los individuos en otros 3 grupos, los que poseen un BMI entre 30-34,9 kg/m² como obesidad de clase 1, entre 35-39,9 kg/m² como obesidad de clase 2 y los que se encuentran en una situación igual o mayor a 40kg/m² como obesidad de clase 3 u obesidad mórbida^{5,6}. Si bien esta clasificación es la que se utiliza de forma más extensa, varios estudios epidemiológicos han demostrado que existen otros indicadores antropométricos también representativos en la evaluación por ejemplo del riesgo CV. Entre ellos se encuentra la circunferencia abdominal, estrechamente relacionada con la cantidad de grasa abdominal, y el índice cintura/cadera, ambos propuestos como predictores de enfermedades metabólicas asociadas a la obesidad⁷⁻¹⁰.

1.1. FISIOPATOLOGÍA DE LA OBESIDAD

La obesidad es una enfermedad metabólica sistémica de origen multifactorial, que se presenta como resultado de una interacción entre factores genéticos, moleculares, ambientales y nutricionales. A nivel genético, se han descrito mutaciones en genes que regulan la saciedad¹¹⁻¹³, cambios en la metilación del ADN del feto en relación a su estado nutricional¹⁴, así como también se ha llegado a estimar la heredabilidad del BMI¹⁵. En lo que se refiere a factores ambientales, destacan un estilo de vida sedentario junto a una dieta poco saludable, donde prevalece el consumo de alimentos procesados e hipercalóricos.

Frente a una situación de balance energético positivo prolongado se produce un incremento en los depósitos de grasa del organismo, que si persiste en el tiempo acaba provocando una disfunción en las células que conforman el tejido graso, alterando su perfil de secreción y su capacidad de almacenamiento. Cuando los lípidos no pueden almacenarse de forma adecuada se acumulan de

forma ectópica en otros órganos, contribuyendo al desarrollo de un fenómeno conocido como lipotoxicidad¹⁶. Dicho fenómeno, se caracteriza por un aumento de ácidos grasos libres (FFA, del inglés *free fatty acids*) circulantes y por la producción de moléculas inflamatorias^{17,18}. La inflamación resultante es considerada en la actualidad como uno de los principales factores involucrados en el desarrollo de las comorbilidades asociadas a la obesidad, como es la T2D, la dislipemia, el hígado graso y la enfermedad CV¹⁸.

1.2. OBESIDAD, RESISTENCIA A LA INSULINA Y T2D

El **sobrepeso y la obesidad** constituyen el principal factor de riesgo modificable en el desarrollo de T2D, tal es así que el 80% de los individuos con T2D presentan sobrepeso en el momento del diagnóstico. Este hecho, junto al impacto colectivo que provocan en la salud mundial, ha permitido que a la coexistencia de ambas entidades se le conozca con el término de “la epidemia gemela” (en inglés *the twin epidemic*)¹⁹.

La **resistencia a insulina** (IR, del inglés *insulin resistance*) constituye un estado patológico en el que los tejidos no son capaces de responder a niveles fisiológicos de insulina, propiciando un estado de hiperinsulinemia compensatoria con el fin de garantizar el correcto funcionamiento del metabolismo glucídico. Esta demanda incrementada, conduce a la disfunción de la célula β pancreática productora de insulina y da lugar a una situación de hiperglicemia permanente. Este mecanismo se ha relacionado con la apoptosis de la célula β y el deterioro irreversible de la homeostasia glucídica^{20,21}, de forma que la IR constituye el evento previo al desarrollo de la T2D²². Por otro lado, la IR, junto con otras alteraciones del metabolismo como la obesidad abdominal, la hipertensión arterial (HTA) y la hiperlipidemia, forman parte de una entidad conocida como síndrome metabólico, que determina un riesgo incrementado de sufrir enfermedad coronaria y cerebrovascular así como T2D, siendo responsable de producir un incremento en el riesgo de mortalidad por todas las causas²³.

La **inflamación** constituye una respuesta fisiológica de protección frente a situaciones de infección o daño tisular, que se caracteriza por un aumento de leucocitos y citoquinas proinflamatorias a nivel local y/o sistémico. Sin embargo, cuando la respuesta inflamatoria es exagerada puede ocasionar efectos perjudiciales como la disfunción tisular. En ese sentido, la obesidad se considera una situación de inflamación sistémica de bajo grado, en la que se produce la activación de diferentes vías de señalización intracelular que interfieren de forma negativa con la cascada de señalización de la insulina provocando resistencia a la acción de dicha hormona²⁴. A modo de ejemplo, se ha descrito que el TNF α (del inglés *tumor necrosis factor α*) induce la fosforilación inhibitoria del IRS-1 (del inglés *insulin receptor substrate 1*), una molécula implicada en la cascada de señalización de la insulina, a través de la activación de vías inflamatorias mediadas por JNK1 (del inglés *c-Jun N-terminal protein kinase 1*) y NF- $\kappa\beta$ (del inglés *nuclear factor $\kappa\beta$*) en células adiposas, hepatocitos y células musculares²⁵. Además, el estado inflamatorio interfiere en el correcto funcionamiento del tejido adiposo (TA), donde se ha visto por ejemplo que TNF α inhibe además al factor de transcripción PPAR γ (del inglés *peroxisome proliferator activated receptors γ*), responsable de la regulación de la síntesis lipídica y la acumulación de grasa en este tejido^{26,27}. La disfunción del TA y la IR provocan un aumento de la actividad lipolítica que conduce a un incremento de los niveles de FFA en circulación. Dicho evento se ha relacionado con la acumulación ectópica de lípidos en tejidos como el músculo esquelético y el hígado, fenómeno que como hemos descrito previamente se conoce como lipotoxicidad. Es por ello, que inflamación, lipotoxicidad y IR son procesos altamente interconectados que se consideran los principales nexos de unión entre obesidad y T2D^{17,28}.

1.3. TRATAMIENTOS DE LA OBESIDAD

En el **tratamiento de primera línea** de la obesidad, se incluyen medidas que comportan la modificación de estilos de vida basados principalmente en la promoción de una dieta saludable y ejercicio físico regular²⁹. Sin embargo, es una realidad que gran parte de los pacientes acaban abandonando estos planes de alimentación y de ejercicio previstos conforme pasa el tiempo, e incluso, hay

casos en los que a pesar de un correcto cumplimiento la pérdida de peso conseguida no alcanza las expectativas esperadas. En ese sentido, las medidas farmacológicas han sido propuestas con el fin de conseguir objetivos más duraderos, pudiendo contribuir entre un 5 y un 15% a la pérdida de peso global³⁰.

En la actualidad, existen 3 **fármacos** autorizados por La Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) para el tratamiento de la obesidad a largo plazo, todos ellos indicados en BMI superior a 30 kg/m² o bien superior a 27 kg/m² en presencia de comorbilidades. Los principios activos de los fármacos en cuestión son el Orlistat, la Liraglutida y la combinación Bupropion-Naltrexona³¹. El Orlistat actúa disminuyendo la absorción de lípidos de la dieta por inhibición de la lipasa pancreática^{32,33}; el Liraglutide es un análogo de incretinas, concretamente del GLP-1 (del inglés, *glucagon-like peptide-1*) que se libera durante la ingesta y que produce un enlentecimiento del vaciado gástrico, así como un efecto anorexigénico a nivel de hipotálamo³⁴⁻³⁶; y finalmente, la combinación Bupropion-Naltrexona que también estimula la saciedad a través de un doble mecanismo, vía neurotransmisores anorexigénicos hipotalámicos y a través del bloqueo de receptores endorfinicos durante la ingesta³⁷⁻³⁹. A pesar de la eficacia demostrada por estos fármacos en la pérdida de peso y el tratamiento de las comorbilidades asociadas, la tasa de abandonos resulta significativa, tanto por efectos secundarios, como debido al elevado coste que supone el tratamiento al no estar financiados por el sistema nacional de salud español (SNS)^{40,41}.

El **abordaje quirúrgico** se considera aplicable a individuos con un BMI mayor o igual a 40kg/m², mayor o igual a 35kg/m² en asociación a otras comorbilidades⁴², o en aquellos pacientes con obesidad severa en los que han fracasado todas las líneas anteriores de tratamiento⁴³. En ese sentido, varios estudios han comparado los resultados obtenidos con la cirugía bariátrica en relación al tratamiento médico, demostrando una mayor efectividad de la cirugía en la pérdida de peso y en el manejo de las comorbilidades asociadas a la obesidad como la HTA, la dislipidemia, la MAFLD, el síndrome de apnea obstructiva del sueño (SAOS), así como en la remisión de la T2D⁴⁴⁻⁴⁶. Por todo ello, en la actualidad se ha pasado a referirse a ella en términos de cirugía metabólica⁴⁷.

De forma general, la **cirugía metabólica** se clasifica en 3 grupos: (a) cirugía restrictiva, que consiste en la reducción del tamaño de la bolsa gástrica; (b) cirugía malabsortiva, en la que se produce un déficit de absorción de nutrientes que contribuye a la pérdida de peso; y (c) cirugía mixta, que resulta de una combinación de las técnicas anteriores. En cuanto a técnicas **restrictivas**, las más utilizadas en la actualidad son; en primer lugar, la gastrectomía en manga (SG, del inglés *sleeve gastrectomy*), donde se secciona aproximadamente un 80% del estómago dejándolo reducido a un tubo estrecho; en segundo lugar, la banda gástrica ajustable, que se coloca alrededor de la porción superior del estómago limitando la cantidad y ralentizando el paso de alimentos; y por último la gastroplastia plicada (LGCP, del inglés *laparoscopic greater curvature plication*), que consiste en plicar la curvatura mayor del estómago sin seccionarlo. Ambas técnicas se realizan por laparoscopia, y como ventajas presentan su sencillez y el hecho de que no alteran la absorción intestinal, mientras que como desventajas, requieren mayor autocontrol por parte del paciente y representan mayor tasa de fracaso a largo plazo, probablemente por la mala selección de los pacientes y por el riesgo de dilatación de la bolsa gástrica. Las técnicas **malabsortivas** se fundamentan en la resección de una gran porción del intestino delgado hasta en un 80%, acompañado de una mínima reducción del volumen estomacal, por lo que el paciente presenta un volumen de ingesta aceptable. Si bien son las técnicas que mayor pérdida de peso provocan y las más efectivas en el tratamiento de la diabetes, a largo plazo comportan déficits nutricionales y más complicaciones a nivel de tracto intestinal, por lo que en la actualidad están en desuso. Finalmente, se encuentran las técnicas **mixtas**, como el bypass gástrico en Y de Roux (RYGB, del inglés *Roux-en-y gastric bypass*), donde se realiza una reducción del volumen estomacal que se complementa con una disfunción parcial del intestino, de alrededor de un 40-45% de la superficie de absorción. Las ventajas son una mayor pérdida de peso y efectividad al cabo de 10 años, y como desventajas comporta mayor riesgo quirúrgico, mayor necesidad de controles, y suplementación alimentaria^{48,49}.

Actualmente, la **elección del tipo de cirugía** (Figura 1) se basa en valorar el balance riesgo-beneficio entre los diferentes procedimientos quirúrgicos disponibles y las características del propio paciente⁵⁰, siendo la SG, el RYGB y

Introducción

la banda gástrica ajustable, los procedimientos que más se utilizan a día de hoy. A pesar de que todos ellos ha demostrado un efecto sustancial en la reducción de peso y la mejora metabólica, el grado de beneficio que presentan no es equivalente. En ese sentido, la técnica que ha mostrado tener un mayor impacto en cuanto a cantidad de peso perdido, como se ha comentado es el RYGB, mostrando una reducción del 27,5% al cabo de 5 años de la intervención, respecto a un 17,8% de la SG y un 10,6% de la banda ajustable. En cuanto a los efectos en la remisión de T2D, un metaanálisis demostró que tanto el RYGB y la SG presenta resultados comparables, aunque la SG comporta menor riesgo quirúrgico y de efectos adversos, por lo que ha pasado a ser la técnica más utilizada^{51,52}.

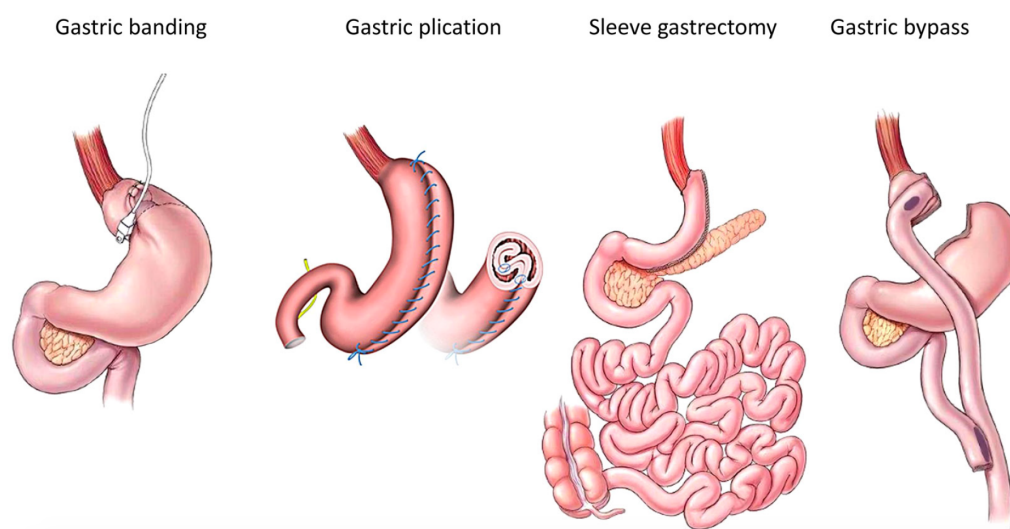


Figura 1: técnicas de cirugía metabólica⁴⁹.

Se sabe que los **beneficios metabólicos** derivados de la cirugía bariátrica se producen de forma relativamente rápida, durante los primeros días o semanas tras la intervención cuando la pérdida de peso aún resulta negligible. Por ello, se ha sugerido la participación de mecanismos que pueden actuar de forma independiente a la pérdida de peso^{53,54}. Aunque el conocimiento de dichos mecanismos es limitado, actualmente se cree que son el resultado de un cúmulo de eventos, entre ellos la propia restricción alimentaria o malabsorción de nutrientes; la afectación de la digestión de carbohidratos, de lípidos y de proteínas; los cambios en la absorción de la glucosa y su metabolismo intestinal;

Introducción

y los cambios a nivel de hormonas gastrointestinales así como de la propia microbiota intestinal. Se ha propuesto que todos ellos determinarían de forma compleja la regulación de las vías de señalización neuroendocrinas implicadas en el comportamiento alimentario, el apetito, la saciedad y el gasto energético (Figura 2)⁴⁹.

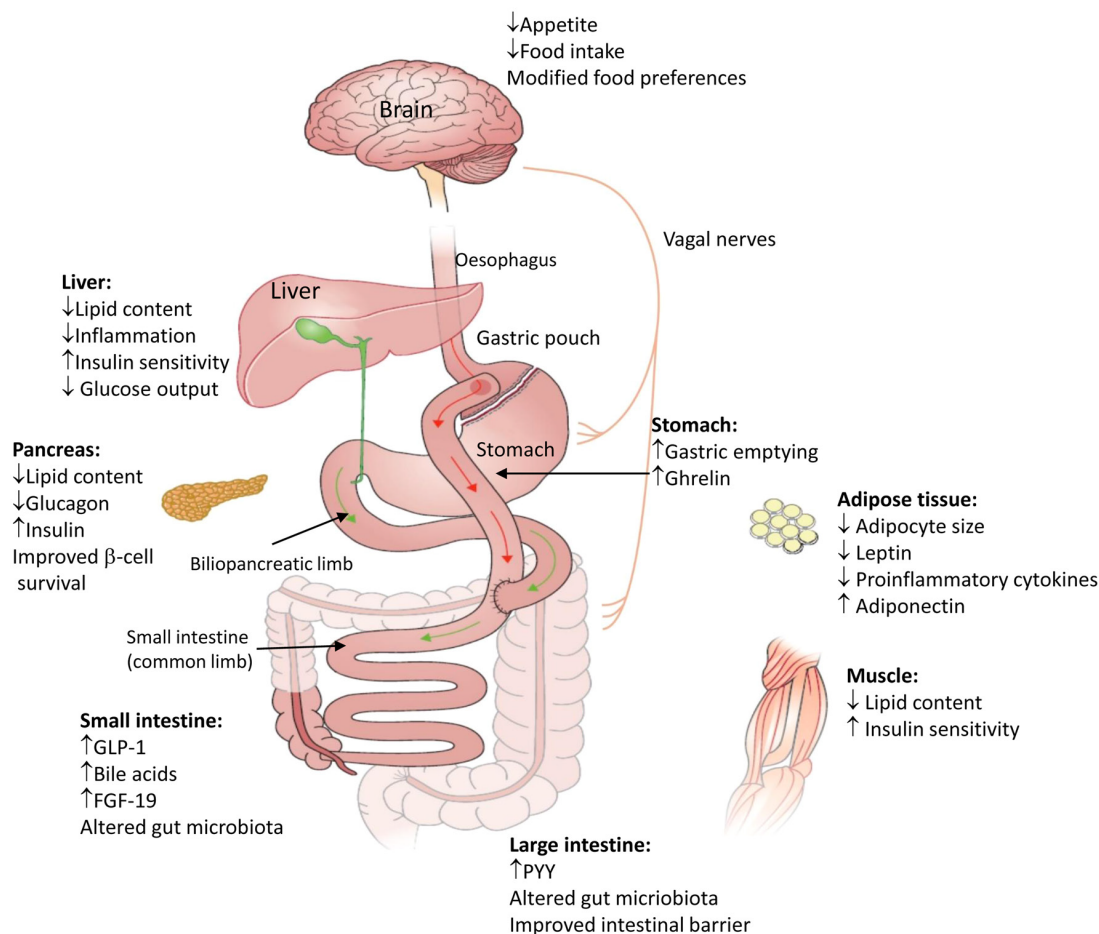


Figura 2. Cambios derivados de la cirugía bariátrica⁴⁹.

Además, en el caso de la **remisión de T2D tras cirugía**, se han propuesto algunos factores adicionales que se cree que pueden actuar como predictores del éxito de la intervención por la influencia que representan en el curso de la enfermedad. Entre ellos, se ha hablado de una mayor cantidad de peso perdido tras la cirugía, así como de otros factores que incluyen un menor tiempo de evolución de la enfermedad, unos niveles de hemoglobina glicosilada (HbA1c) menores y un menor requerimiento de terapia insulínica previos a la cirugía^{55,56}.

2. ÓRGANO ADIPOSO

El TA se compone de una amplia variedad de tipos celulares y constituye además el principal órgano de reserva del organismo gracias al tipo celular principal que lo compone, **el adipocito**. El adipocito es una célula especializada que se encarga de la captación de ácidos grasos que le llegan de la circulación a través de quilomicrones provenientes de la ingesta, y que son reesterificados para poder ser almacenados en forma de triglicéridos (TG). En mamíferos, este tejido se distribuye a lo largo de diferentes localizaciones conocidas como depósitos de TA, que presentan algunas peculiaridades que permite diferenciarlos en cuanto a características y funcionalidad. Sin embargo, es debido a su importante función metabólica, endocrina y reguladora que se hace referencia a él en su conjunto como órgano adiposo⁵⁷.

2.1. TIPOS DE TEJIDO ADIPOSO

A nivel histológico es posible distinguir 3 tipos diferentes de TA, que además presentan diferencias en cuanto a características funcionales, de localización, y de origen^{58,59}, estos son el **tejido adiposo blanco** (WAT, del inglés *white adipose tissue*), el **tejido adiposo marrón o pardo** (BAT, del inglés *brown adipose tissue*), y el **tejido adiposo Beige o Brite** (del inglés *brown in white*). El BAT y el Beige se caracterizan por tener la habilidad de disipar energía en forma de calor, contribuyendo así al mantenimiento de la temperatura corporal y al balance energético. Este proceso es posible gracias a la expresión de la proteína UCP1 (del inglés *uncoupling protein-1*) en la membrana interna mitocondrial, encargada del desacoplamiento de la síntesis de ATP en la cadena de transporte de electrones durante la respiración celular. Esta función, que se conoce como termogénesis no temblorosa, se encuentra activada de forma permanente en el BAT, y puede verse incrementada bajo ciertos estímulos como la exposición al frío^{60,61}, un incremento en los niveles de hormonas tiroideas⁶², una ingesta calórica excesiva⁶³, o la presencia de ciertos niveles de ácidos grasos u otros nutrientes en circulación^{64,65}. En el caso del TA beige, esta función depende exclusivamente de que tenga lugar un proceso conocido como

“browning” del TA, por el que se originan adipocitos beige dentro del propio WAT, tras estímulos como los mencionados anteriormente⁶⁶. Dada su dispersa localización dentro del WAT, resulta complejo determinar la cantidad de TA Beige presente en el organismo. Por el contrario, el BAT se localiza en ciertas áreas anatómicas como la cervical, axilar y paraespinal, por lo que se ha estimado que puede representar entre un 1-2% del total de la masa adiposa⁶⁷. A nivel celular, las principales características que definen al adipocito de ambos tejidos son: (a) la disposición de los TG en forma de pequeñas gotas lipídicas dispersas en el citoplasma, (b) su elevada densidad de mitocondrias, y (c) una batería de genes específicos que intervienen en el proceso de termogénesis.

En cuanto al WAT, al contrario de lo que ocurre con los otros dos tejidos, constituye la mayor parte de la masa adiposa (alrededor del 95% del total), siendo por ende el principal tejido de reserva del organismo⁶⁷. La característica morfológica que distingue al adipocito blanco es la presencia de una única y gran gota lipídica que ocupa casi la totalidad del citoplasma. Y al contrario de lo que ocurre en el adipocito beige y marrón, este no tiene capacidad de llevar a cabo la termogénesis no temblorosa y posee una baja densidad de mitocondrias. En esta tesis nos centraremos en las características de este tejido, así como en su papel en el metabolismo y homeostasis energética, como se detallará a continuación.

2.2. TEJIDO ADIPOSO BLANCO

El WAT posee una gran variedad de funciones que lo convierten en uno de los principales tejidos involucrados en la homeostasia energética. En cuanto a su papel más conocido como órgano de reserva, tiene la función de proporcionar sustrato energético al resto de tejidos en situación de demanda, como es el caso de un aporte limitado de nutrientes exógenos o de un ayuno prolongado. Para ello, pone en marcha el proceso de hidrólisis de los TG almacenados en el adipocito, a partir de los cuales se obtienen FFA, que son transportados a la circulación para que puedan ser captados y utilizados por el resto de tejidos. A pesar de esta función universal, conviene remarcar como se verá más adelante,

que posee funciones adicionales importantes. Y que presenta características y propiedades diferenciales en lo que respecta a su localización y condiciones del medio que le rodea⁶⁸.

2.2.1. Capacidad expansiva del tejido adiposo blanco

El WAT es considerado uno de los órganos con mayor plasticidad en el organismo, cualidad que se le atribuye en parte, por su capacidad de incrementar en masa y volumen en respuesta a un balance energético positivo crónico. Existen dos mecanismos implicados en la expansibilidad o incremento de la capacidad de reserva de este tejido. Uno de ellos, involucra el aumento de tamaño de los adipocitos, fenómeno que se conoce como **hipertrofia**, y el otro, implica un aumento en número a partir de células precursoras, proceso conocido como **hiperplasia**. Hasta hace pocos años se creía que la hipertrofia era el principal mecanismo implicado en el incremento de la adiposidad en el individuo adulto. Sin embargo, el estudio de la dinámica del WAT, mediante el uso de ¹⁴C como trazador, determinó la presencia de un recambio y reclutamiento constante de células adiposas que tiene lugar a lo largo de la vida adulta del individuo y que comportaría alrededor de un 10% de renovación anual de la masa adiposa en este tejido⁶⁹.

La hipótesis de la **expansibilidad del tejido adiposo** sostiene que el WAT es capaz de incrementar su capacidad de almacenamiento de lípidos en situación de ingesta excesiva de nutrientes, hasta unos límites que vendrán determinados por factores ambientales y genéticos de cada individuo, de modo que cuando estos se ven sobrepasados, aparecen las complicaciones metabólicas derivadas de la obesidad. Una vez excedidos dichos límites, los lípidos no pueden ser almacenados de forma correcta y se produce el fenómeno de lipotoxicidad, que tal y como se ha comentado previamente contribuye al desarrollo de resistencia a la insulina^{16,17}. En este contexto, se produce un aumento del tamaño de los adipocitos u obesidad hipertrófica, que se relaciona a su vez con una limitada capacidad de reclutamiento de nuevas células adiposas^{70,71} y con una predisposición a desarrollar resistencia a la insulina^{72,73}. En concreto, se cree que la hipertrofia excesiva de los adipocitos es la

responsable de los cambios fisiopatológicos que subyacen a la enfermedad metabólica, como el defecto en la perfusión que conduce a hipoxia tisular, la apoptosis de los adipocitos inducida por estrés mecánico y el incremento de mediadores de la inflamación⁷⁴.

Por el contrario, un incremento preservado de la capacidad de hiperplasia del TA subcutáneo se ha asociado a beneficios metabólicos, como aumento de la sensibilidad a la insulina y menor riesgo de desarrollar diabetes de tipo 2^{75,76}. Esta capacidad expansiva del WAT podría explicar, en parte, porqué hay individuos que si bien son obesos, no poseen ningún factor de riesgo CV, como la IR, la T2D, la hipertrigliceridemia o la HTA, y que en este contexto se les ha denominado de forma clínica como obesos metabólicamente sanos⁷⁷. Resulta importante remarcar que la “obesidad metabólicamente sana” no debe de considerarse una condición segura que pueda prescindir de tratamiento. De hecho, se podría considerar un estado transitorio en el paso hacia un fenotipo metabólicamente perjudicial. Por ello, la recomendación clínica continua siendo la pérdida de peso, ya que el riesgo que poseen estos pacientes de sufrir enfermedad CV resulta incrementado respecto al de población con normopeso⁷⁷.

2.2.2. Tipos de tejido adiposo blanco

El WAT es un tejido heterogeneo que se puede diferenciar fundamentalmente en base a su localización y características, de forma que a nivel metabólico destacan dos grandes depósitos. Por un lado, el TA visceral (vWAT, del inglés *visceral white adipose tissue*) y por otro, el TA subcutáneo (scWAT, del inglés *subcutaneous white adipose tissue*). El scWAT, representa aproximadamente el 80% de la masa grasa en una persona con normopeso y se halla ubicado debajo de la piel, con predominio en la zona externa al peritoneo y la zona glúteo-femoral. El vWAT, por otro lado, representa entre un 10-20% de la masa grasa en el sexo masculino, y entre un 5-8% en el femenino, y se localiza en la zona del peritoneo en contacto directo con los órganos internos, como se puede apreciar en la figura 3⁷⁸. En cuanto a su metabolismo, se ha observado que ambos tejidos presentan diferencias destacables, de modo que un incremento de vWAT se asocia con un mayor riesgo de padecer alteraciones

metabólicas como IR, T2D y enfermedad CV^{79,80}, mientras que la expansión del scWAT se relaciona con un mejor perfil metabólico, incluyendo mayor sensibilidad a la insulina y menor riesgo de desarrollar T2DM⁸¹. De hecho, se ha descrito que el trasplante intrabdominal de scWAT en ratones obesos, parece mejorar la IR y la tolerancia a la glucosa^{82,83}. Por otro lado, la reducción de vWAT se asocia a una disminución en los niveles circulantes de glucosa, a un aumento de la sensibilidad a insulina, y a una reducción en los niveles de colesterol y TG^{84,85}. Estudios en modelos animales han permitido demostrar que estas diferencias no son debidas únicamente a una cuestión de localización, sino que al parecer los adipocitos procedentes de ambos depósitos tienen su origen en diferentes células precursoras^{86–89}.

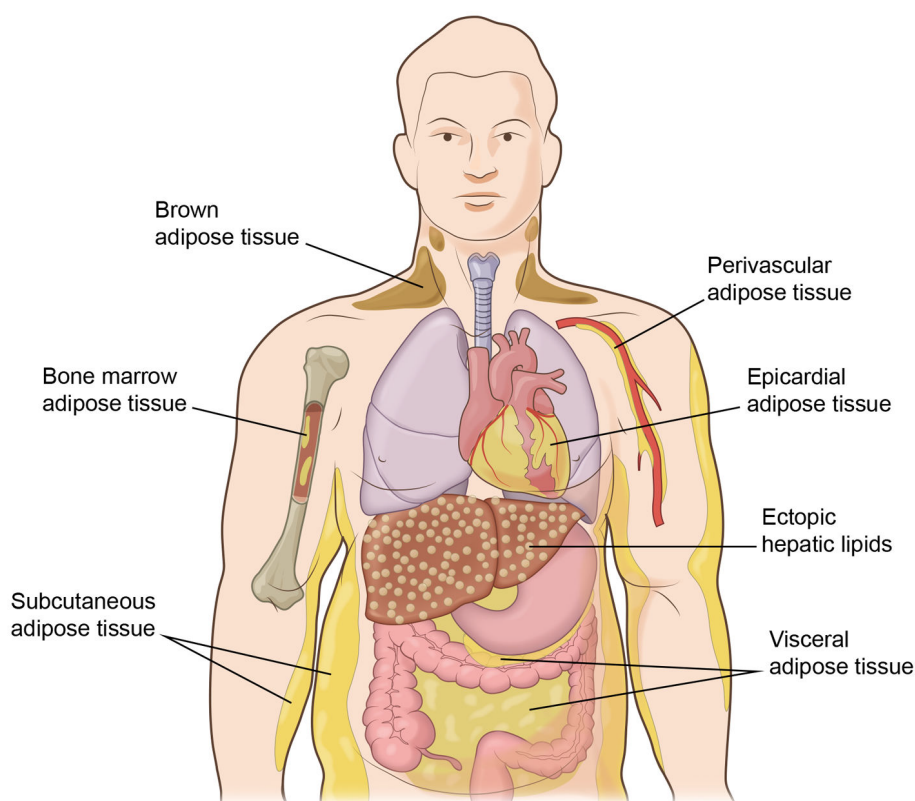


Figura 3. Localización de los distintos tipos de TA en el cuerpo humano⁹⁰.

2.2.3. Tejido adiposo blanco como órgano endocrino

Entre sus muchas otras funciones, cabe destacar el importante papel que tiene el TA como órgano endocrino. Este tejido es capaz de secretar un gran número de mediadores con acción sistémica, paracrina y autocrina, de gran

importancia a nivel metabólico, tal y como se resume en la figura 4. En este apartado se hará referencia concretamente al WAT y a la secreción de algunas de sus moléculas principales.

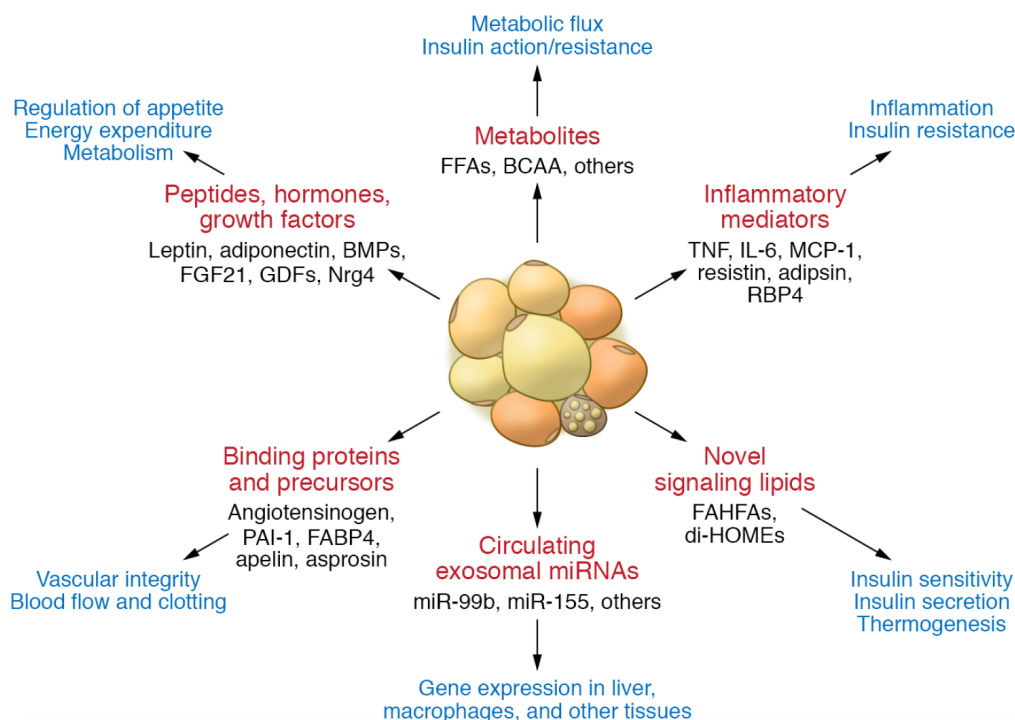


Figura 4. Resumen de las principales moléculas secretadas por el TA y su efecto en el metabolismo⁶⁷.

Entre las principales hormonas secretadas por el WAT encontramos la **leptina**, una proteína de 16 kDa producida principalmente por el adipocito blanco de forma pulsátil y siguiendo un patrón circadiano. Su secreción también se encuentra regulada por la alimentación, de modo que aumenta durante las primeras horas tras la ingesta produciendo un efecto inhibitorio sobre el apetito e incrementando el gasto energético por acción sobre su receptor (LEPR, del inglés *leptin receptor*) expresado en hipotálamo^{91,92}. En situación de ayuno por el contrario, los niveles de leptina se ven reducidos, por lo que tiene lugar un incremento de la ingesta y una disminución del gasto energético^{93,94}. El receptor de leptina también es expresado de forma amplia por diversos tejidos, donde

media otras funciones como el mantenimiento óseo, del sistema inmune y la angiogenesis⁶⁷.

Otra de las principales hormonas producida por el adipocito blanco, aunque no de forma exclusiva, es la **adiponectina**, una proteína de unos 30 kDa cuyos niveles se encuentran relacionados de forma inversa con la cantidad de TA. A nivel de sistema nervioso central (SNC), la adiponectina estimula el apetito y reduce el gasto energético⁹¹, mientras que, a nivel de tejidos periféricos mejora la sensibilidad a la insulina a través de los receptores AdipoR1 en músculo, y AdipoR1 y AdipoR2 en hígado⁹⁵.

El WAT también secreta múltiples factores de crecimiento como el FGF21 (del inglés *fibroblast growth factor 21*), y diversas proteínas de la familia de las BMPs (del inglés *bone morphogenetic proteins*), del TGF- β (del inglés *transforming growth factor beta*) y de los VEGFs (del inglés *vascular endothelial growth factor*) con importantes implicaciones en el desarrollo, mantenimiento y diferenciación celular⁶⁷. Además, secreta otros péptidos o adipoquinas como la resistina, el RBP4 (del inglés *retinol-binding protein 4*), la apelina y la omentina, que se han relacionado con la fisiopatología de la resistencia a la insulina y el síndrome metabólico⁹⁶⁻⁹⁸. Se sabe que el patrón de secreción presenta cierta variabilidad en relación al tipo de TA. Además, en un contexto de obesidad se produce una desregulación de su función endocrina, con un incremento de adipoquinas proinflamatorias, una reducción de la hormona anti-inflamatoria adiponectina y un aumento crónico de los niveles de leptina que inducen un estado de resistencia a la misma.

2.2.4. Células del tejido adiposo blanco

El WAT es un tejido formado por una gran variedad de poblaciones celulares, entre las cuales se encuentra el adipocito blanco y todo un conjunto de células que forman parte de lo que se conoce como la fracción estroma vascular (SVF, del inglés *stromal vascular fraction*). A pesar de que el adipocito blanco representa alrededor del 90% del volumen tisular, tan solo se corresponde con el 20-40% de su contenido celular, el resto estaría compuesto

por la SVF⁸⁹. La proporción de células que conforman la SVF puede variar en función de la naturaleza del TA, incluyendo el tipo, localización, o el ambiente metabólico en el que se encuentre. De forma general, los tipos celulares presentes son: células madre mesenquimales (ASCs, del inglés *adipose derived stem cells*), preadipocitos, células vasculares, fibroblastos y células del sistema inmunitario⁸⁹. Estas células llevan a cabo funciones cruciales para la homeostasia del WAT, como el mantenimiento de la matriz extracelular, la función de adipogénesis y angiogénesis, la preservación de la sensibilidad a la insulina, el aclaramiento de células apoptóticas y la defensa contra patógenos exógenos y moléculas dañinas⁹⁹. Las células inmunitarias representan la mayor parte del SVF y se dividen en componentes de la inmunidad innata, como los neutrófilos, eosinófilos, mastocitos, células dendríticas, linfocitos NK (del inglés *natural killer*) y macrófagos; y en células de la inmunidad adaptativa, que son los linfocitos y células B y T⁹⁹.

En un individuo con normopeso predomina un fenotipo de células de tipo antiinflamatorias o de inmunidad tipo 2, incluyendo células Treg (T reguladoras), Th2 (del inglés *T helper type 2*), iNKT reguladoras (del inglés *invariant natural killer T cells*), eosinófilos, ILC2s (del inglés *type 2 innate lymphoid cells*) y macrófagos M2. Por el contrario, en un estado de obesidad tiene lugar una remodelación tisular que determina un perfil celular de tipo proinflamatorio⁹⁹. A pesar de que se han propuesto varios mecanismos no excluyentes por los que parece ser que se produce este remodelado celular, la hipótesis de la hipoxia como factor desencadenante del proceso inflamatorio en obesidad es de las más aceptadas. Actualmente, se sabe que la hipoxia del WAT en el individuo obeso estabiliza e incrementa la expresión del factor de transcripción HIF1 α (del inglés *hypoxia inducible factor*) en el adipocito, que induce la expresión de múltiples genes inflamatorios en el WAT, así como quimiocinas y genes relacionados con la fibrosis del tejido¹⁰⁰. En respuesta a este proceso, se incrementa además el reclutamiento y activación de células inmunes, produciendo un estado inflamatorio de bajo grado que se relaciona con la patogénesis de la obesidad y sus comorbilidades¹⁸. En concreto, en esta tesis se hará referencia a un tipo en particular de célula inmune, el macrófago.

2.3. MACRÓFAGO DE TEJIDO ADIPOSO

El **macrófago** es una célula que pertenece a la línea mieloide y que participa en la respuesta inmunitaria innata. Así, sus función principales son la detección, fagocitosis y destrucción de moléculas dañinas para el organismo; así como también, la presentación de antígenos e inicio de la respuesta inflamatoria. Este tipo celular se encuentra presente en casi la totalidad de los tejidos del organismo y adquiere variaciones en su fenotipo y funciones en base a su localización. De esta forma, a los macrófagos presentes en el hueso se les denomina “osteoclastos”, a los que se encuentran en hígado “células de Kupffer”, a los del tejido cerebral “microglia” y a los residentes en el TA “ATMs” (del inglés *adipose tissue macrophages*)¹⁰¹ entre otros tejidos.

La aparición de nuevos macrófagos en tejido depende básicamente de dos mecanismos, por un lado el reclutamiento de nuevas células a partir de precursores monocíticos^{102,103}, y por otro de la proliferación in situ de los macrófagos residentes del propio tejido^{104–106}. Varios estudios en modelos de ratón han demostrado una dualidad en cuanto a la procedencia de los macrófagos de tejido, con un origen prenatal a partir de células del saco vitelino y de células hematopoyéticas de hígado fetal; y con un origen hematopoyético a partir de precursores circulantes que se instalan en el tejido y proliferan para dar lugar a macrófagos procedentes de médula ósea (BMDMs, del inglés *Bone marrow derived macrophages*)¹⁰¹.

Se sabe que en situación de normopeso los ATMs del WAT representan aproximadamente el 10% de su contenido celular, y que son capaces de incrementar en número hasta alcanzar más del 40% en situación de obesidad¹⁰⁷. El proceso iniciador se atribuye a la apoptosis que sufren los adipocitos hipertróficos, que provoca la liberación masiva de mediadores de la inflamación y la activación de cascadas inflamatorias que promueven el reclutamiento de precursores y proliferación de macrófagos en el tejido¹⁰⁸. Entre dichos mediadores se encuentra la citoquina proinflamatoria TNF α y la quimiocina MCP-1 (del inglés *monocyte chemotactic protein-1*) que funcionan como sustancias quimioatrayentes¹⁰⁹.

El incremento de ATMs dentro del TA inflamado se puede evidenciar gracias a su tendencia a formar unas estructuras características en forma de corona (**CLS**, del inglés *crown-like structures*) alrededor de los adipocitos apoptóticos^{110,111}. Se cree que el mecanismo por el que se originan es dependiente de la imposibilidad de englobar a dichas células hipertrofiadas para llevar a cabo su fagocitosis. De forma que los macrófagos liberan el contenido enzimático de sus lisosomas, generando un compartimento extracelular acidificado que promueve la degradación y liberación de ácidos grasos (FA, del inglés *fatty acids*). Estos macrófagos que acaban cargados con grandes cantidades de lípidos adquieren la disposición de CLS característica. Se postula que su función consiste en impedir la acumulación ectópica de lípidos y el desarrollo de lipotoxicidad^{110,112}.

2.3.1. Papel del macrófago en el WAT

En situación de normopeso es posible encontrar en el WAT un predominio de macrófagos con características **antiinflamatorias** cuya actividad se relaciona con propiedades reguladoras del sistema inmunitario, de reparación y remodelación tisular, así como de preservación de la sensibilidad a la insulina. Mientras que en individuos obesos resulta más prevalente la población de macrófagos **proinflamatorios**, cuya función fundamental es la activación de la respuesta inmunitaria inflamatoria y la eliminación de productos de desecho y antígenos del organismo⁹⁹.

A los **macrófagos inflamatorios** se les ha atribuido un papel importante en el deterioro de la acción de la insulina en el adipocito, principalmente relacionados con la activación de vías de señalización que involucran quinasas proinflamatorias como IKK (del inglés *I κ B kinase*) y JNK, a través de mediadores secretados por ellos mismos¹¹³. El incremento de estas células en el individuo obeso comprende tanto el fenómeno de **reclutamiento** y diferenciación a partir de precursores monocíticos, como se ha mencionado con anterioridad; como también un proceso de transformación *in situ* descrito como “switch” o “**switching**” de los macrófagos¹¹⁴, que depende de un ambiente rico en mediadores de la inflamación y en el que los macrófagos residentes con

características antiinflamatorias pasarían a adquirir propiedades de tipo inflamatoria.

2.3.2. Plasticidad del macrófago

Si bien la forma de identificar a los macrófagos en base a un espectro de activación bidimensional proinflamatorio/antiinflamatorio resulta muy útil para la comprensión de sus mecanismos de activación, hay numerosas evidencias que demuestran que *in vivo* esta delimitación no resulta precisa y que por el contrario, existe una amplia variedad de **fenotipos intermedios** entre ambos extremos^{115,116}. Se ha descrito que los ATMs de individuos obesos, a diferencia de lo que ocurre en modelos murinos, presentaran un fenotipo con características inflamatorias mixtas, expresando de forma simultanea marcadores típicos tanto antiinflamatorios como proinflamatorios¹¹⁷. Por otro lado, existen también estudios que indican que el fenotipo de los macrófagos varía en función del depósito en el que se localizan, de modo que los macrófagos procedentes de scWAT parecen presentar abundante expresión de marcadores antiinflamatorios, mientras que los de vWAT, estarían dotados de ciertas características de tipo más inflamatorias, en relación a los anteriores^{118,119}.

En cuanto a la **clasificación** de los fenotipos de macrófagos, se ha utilizado de forma clásica su habilidad para polarizarse en respuesta a diferentes estímulos *in vitro*. De forma que se emplea el término de macrófagos naïve o “**M0**” para referirse a aquellas células diferenciadas que aún no han recibido estímulos para inducir un fenotipo funcional determinado. Los macrófagos de tipo **M1** o “activados de forma clásica” son aquellos a los que se les ha inducido un fenotipo proinflamatorio, tras su estimulación típicamente con lipolisacáridos (LPS), interferón- γ (IFN- γ) o TNF- α , como se aprecia en la figura 5. Por último, los macrófagos **M2** o “activados por la vía alternativa”, presentan características antiinflamatorias y surgen como resultado de la estimulación con interleuquina 4 (IL-4), interleuquina 10 (IL-10), interleuquina 13 (IL-13) o glucocorticoides. Estos a su vez, han sido subclasificados en función del estímulo específico empleado, pudiendo diferenciarse en fenotipos intermedios denominados como “M2a”, “M2b” o “M2c”^{115,116,120}.

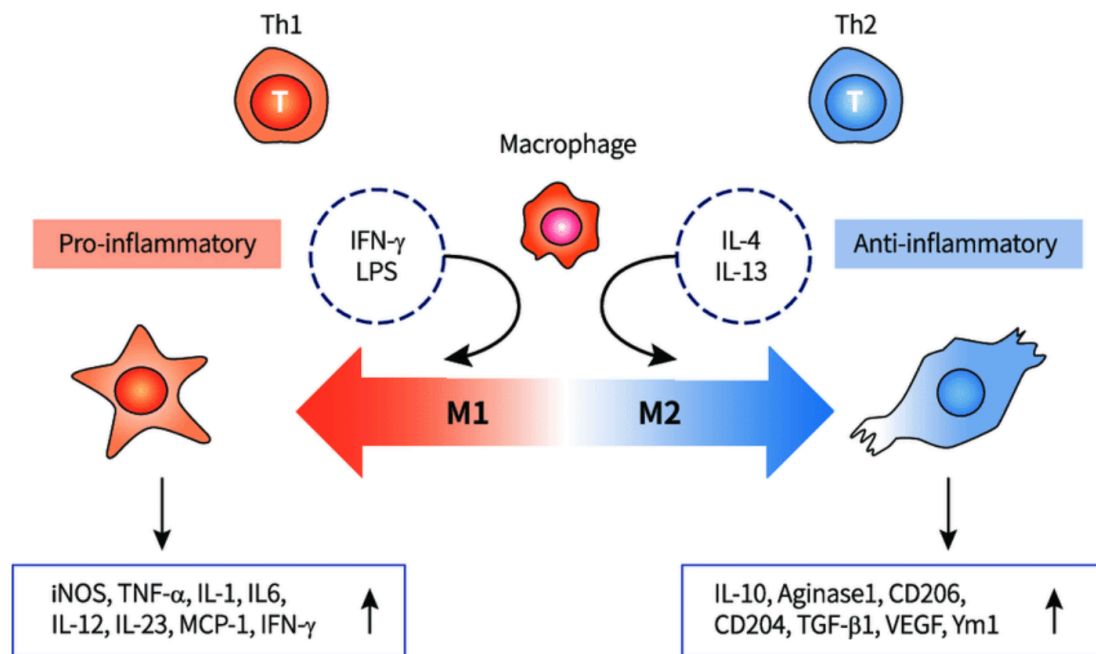


Figura 5. Polarización y fenotipo de macrófagos¹²⁰.

La **característica** fundamental de los macrófagos de tipo M1 es la secreción de citoquinas proinflamatorias como el TNF α , la interleuquina 6 (IL-6), la interleuquina 1 (IL-1) y el óxido nítrico (NO, del inglés *nitric oxid*). Por otro lado, los macrófagos M2 producen citoquinas antiinflamatorias como IL-10, IL-4, IL-1RA (del inglés *interleukin-1 receptor antagonist*), y TGF- β ¹¹⁵. Los macrófagos también presentan un perfil de marcadores de superficie celular diferencial en base a su fenotipo, que hace posible su diferenciación mediante técnicas de citometría y/o inmunohistoquímica. En concreto, los macrófagos murinos que son los que han sido más ampliamente estudiados y los mejor caracterizados, son reconocidos a través de las proteínas F4/80 y CD11b. Marcadores que si se combinan con el CD11c permiten la identificación de macrófagos M1, o que si por el contrario, se combinan con CD301 y CD206 posibilitan la identificación de los de fenotipo M2¹¹⁴.

El empleo de cultivos primarios de macrófagos y monocitos murinos de las cepas Balb/c y C57BL/6, así como el cultivo de líneas celulares tanto de humanos como murinas han aportado una mayor comprensión respecto a los

mecanismos implicados en la diferenciación y polarización de estas células. Para llevar a cabo la diferenciación *in vitro* de los macrófagos a partir de células precursoras se emplean los factores estimuladores de colonias GM-CSF (del inglés *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) y M-CSF (del inglés *monocyte colony stimulating factor*), que son glucoproteínas que poseen propiedades en la modulación de la hematopoyesis, en el control de la supervivencia, la proliferación y la diferenciación celular¹²¹. En concreto, bajo la influencia del factor M-CSF es posible obtener macrófagos con características similares a las de un estado fisiológico, proclives a adquirir un fenotipo diferencial en función de los estímulos a los que se exponga, en tanto que con el factor GM-CSF se obtienen macrófagos con características de tipo inflamatorias y que resultan más típicos de la localización alveolar¹²¹.

2.3.3. Macrófago e inmunometabolismo

El término **inmunometabolismo** abarca dos aspectos básicos, por un lado el efecto de la inflamación y la respuesta inmune en el control del metabolismo a nivel sistémico; y por otro, las alteraciones sobre el metabolismo de las células inmunitarias y como influye este en su actividad inmunológica^{122,123}. En este contexto, la **reprogramación metabólica** celular, que hace referencia a los cambios en el programa metabólico de las células especialmente a nivel de mitocondria, en respuesta a estímulos antiinflamatorios o proinflamatorios, constituye un hecho clave en la determinación del fenotipo de los macrófagos, en el proceso de “switching” y en la capacidad para llevar a cabo sus funciones en respuesta al estado fisiopatológico del organismo^{122,124}.

Los macrófagos antiinflamatorios o M2 se caracterizan por presentar una incrementada actividad oxidativa, a través de la vía de la **fosforilación oxidativa** (OXPHOS, del inglés *oxidative phosphorylation*) de la membrana interna mitocondrial, sin que se produzcan modificaciones en la ruta de señalización del TCA (del inglés *tricarboxylic acid cycle*), siendo los FA y la glucosa sus fuentes principales de sustrato energético. Por otro lado, como se ha mencionado previamente, ciertos estímulos inflamatorios son capaces de propiciar un cambio desde un fenotipo antiinflamatorio u homeostático hacia uno con características

inflamatorias pasando de un metabolismo oxidativo hacia uno glicolítico. De hecho, los macrófagos de tipo M1 se caracterizan por una disrupción de la vía del TCA, y un incremento de la **actividad glicolítica** en situación de adecuada disponibilidad de O₂, motivo por el que a esta vía que permite una rápida obtención de energía con la que llevar a cabo funciones de fagocitosis y bactericidas de la célula se la conoce como glicólisis aeróbica¹²².

El **bloqueo en el TCA** producido en el macrófago inflamatorio, conduce a la acumulación de metabolitos intermediarios como el citrato¹²⁵, el itaconato¹²⁶ y el succinato¹²⁵ (Figura 6), que cobran importancia debido a su demostrada participación en la respuesta inmune inflamatoria¹²⁷. De forma que los cambios metabólicos que sufren las células inmunitarias, además de tener un papel en la elaboración de precursores de biosíntesis y de ATP para su funcionamiento, proporcionan metabolitos celulares capaces de actuar en sí mismos como moléculas de señalización con relevantes funciones en la respuesta inmune del organismo^{128,129}.

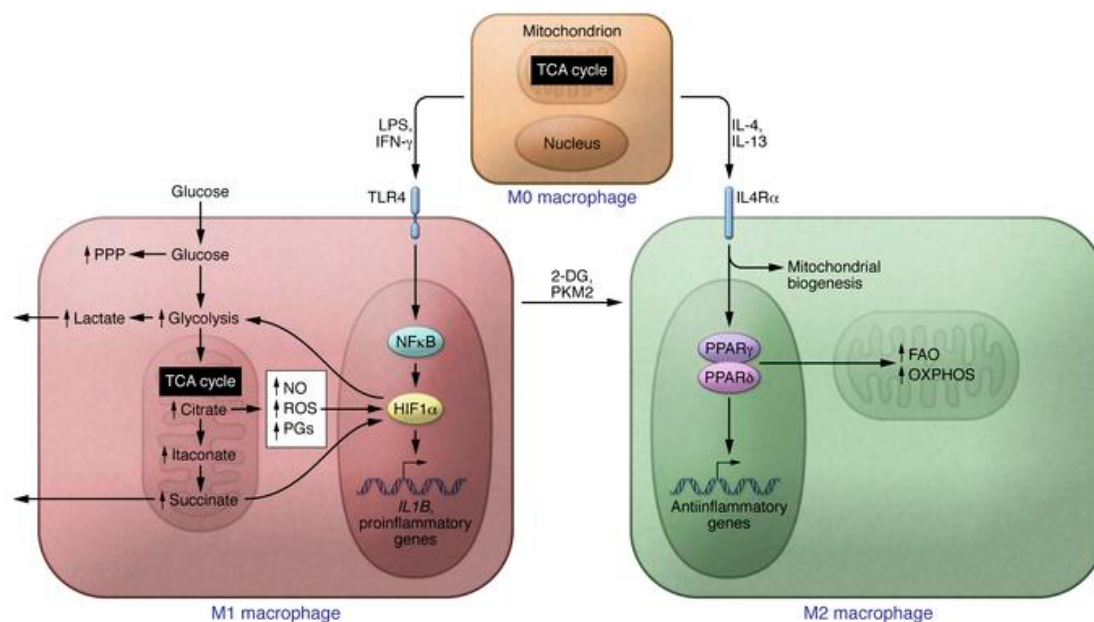


Figura 6. Reprogramación metabólica de los macrófagos¹²⁴.

3. SUCCINATO Y SUCNR1

3.1. SUCCINATO COMO SUSTRATO ENERGÉTICO

El succinato o ácido succínico a pH sanguíneo, es un ácido dicarboxílico conocido por su función de metabolito intermediario de la vía del TCA en la matriz mitocondrial, y como sustrato energético de la fosforilación oxidativa llevada a cabo en la membrana de la mitocondria, por lo que ocupa un lugar crucial en el metabolismo celular como componente de ambas vías¹³⁰. En el TCA, el succinato se origina a partir del succinil-CoA y es oxidado a fumarato por la succinato deshidrogenasa (SDH), enzima que también participa en la cadena de transporte de electrones de la membrana interna de la mitocondria, donde recibe el nombre de complejo II. De esta forma la SDH constituye un nexo de unión entre las vías del TCA y la OXPHOS¹³¹.

En condiciones fisiológicas la **mitocondria** es la fuente principal de succinato de los tejidos “estériles”. Mientras que en las mismas condiciones, la fuente principal de succinato del lumen gastrointestinal es la densa población de **microorganismos** productores de succinato (Figura 7)^{132,133}. Este proceso tiene lugar a partir de la fermentación anaeróbica de carbohidratos en el intestino distal que en mamíferos es llevada a cabo principalmente por el filo Bacteroidetes, un tipo de bacterias que se presentan de forma abundante en la microbiota intestinal¹³². En condiciones fisiológicas este succinato podría ser rápidamente consumido, tanto por otras bacterias como por las propias células intestinales, razón por la cual se cree sus niveles son bajos en el lumen intestinal^{132,133}. De hecho, durante mucho tiempo el succinato es había considerado un mero intermediario en la síntesis de propionato, un ácido graso de cadena corta (SCFA, del inglés *short chain fatty acids*) producido por bacterias de los géneros *Bacteroides spp.*, *Prevotella spp.* y algunas de la clase Firmicutes¹³⁴. No obstante, literatura reciente apunta al succinato como un producto final de la microbiota intestinal, que podría estar jugando un papel relevante en la interacción existente entre huésped-microbiota, clave en el correcto funcionamiento de nuestro organismo¹³³.

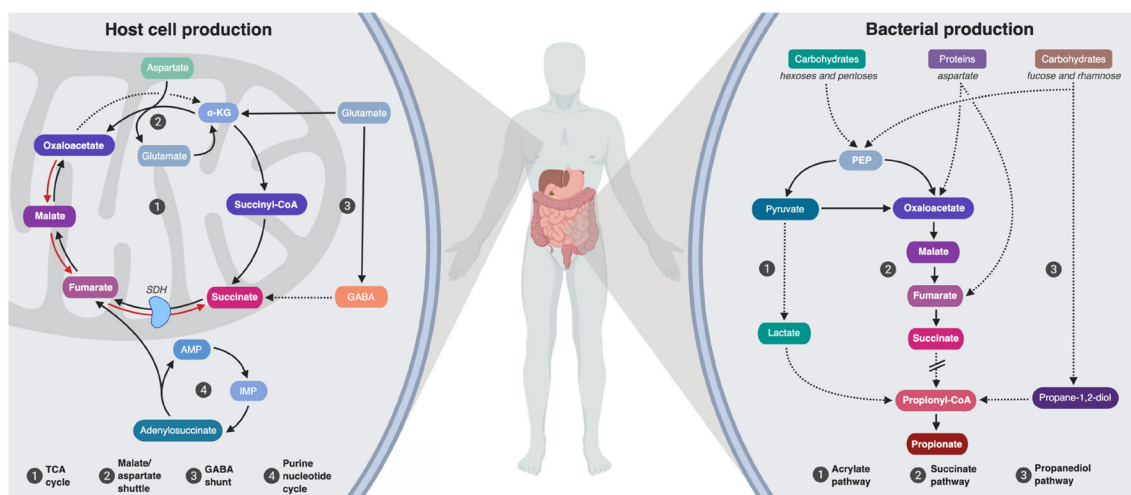


Figura 7. Fuentes de succinato en el organismo¹³³.

3.2. SUCCINATO COMO MOLÉCULA DE SEÑALIZACIÓN

Además de su papel como sustrato energético, se ha demostrado que el succinato puede acumularse en ciertas situaciones patofisiológicas, relacionadas especialmente con procesos de inflamación y de estrés metabólico¹³⁰, siendo capaz de llevar a cabo funciones clave en la señalización celular tanto a nivel específico de tejido como a nivel sistémico^{129,135–139}. Como mecanismo involucrado en el aumento de los niveles de succinato en situación de estrés celular se encuentra la producción de radicales libres (RL). Los RL o ROS (del inglés *reactive oxygen species*) son compuestos prooxidantes derivados del O₂, que se originan principalmente en la cadena respiratoria de la mitocondria a partir de un proceso de reducción incompleta del O₂, aunque también pueden provenir de fuentes externas como contaminantes. Los ROS oxidan macromoléculas biológicas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos generando así otros RL orgánicos que incrementan aún más el daño, el envejecimiento y la muerte celular. En condiciones fisiológicas, la célula mantiene un balance entre producción de moléculas prooxidantes y sistemas de defensa antioxidantes, de modo que cuando se pierde este equilibrio tiene lugar el estrés oxidativo. La sobreproducción de ROS provoca daño a nivel del DNA mitocondrial con efecto perjudicial en el funcionamiento de componentes de la cadena de transporte de electrones y de la vía del TCA, esto produce una

modificación de la actividad de diversas enzimas con acción reversible en el TCA, propiciando un funcionamiento reverso de dicha vía para generar NAD⁺ (nicotinamida adenina) y malato como productos metabólicos^{140,141}. Cuando la SDH actúa de forma inversa cataliza la reducción de fumarato a succinato (Figura 8), como sucede en situaciones de isquemia y baja disponibilidad de O₂¹⁴². Por otro lado, la acción de la enzima α -KGDH (del inglés *α -ketoglutarate dehydrogenase*) que es irreversible, en estas condiciones preserva su función por lo que se produce un flujo anterogrado oxidativo y uno retrogrado reductivo que coinciden en la generación de succinato^{143,144}. Además, la participación de la lanzadera malato-aspartado y el ciclo de los nucleótidos purinas en la generación de fumarato, constituye otro mecanismo por el que se ve aumentada la síntesis de succinato en el TCA reverso^{145,146}.

Para poder sustentar el funcionamiento de la vía del TCA afectada, es preciso que se supla de otros sustratos energéticos a través de un proceso que se conoce como anaplerosis¹⁴⁷. En condiciones normales, en el TCA se produce la condensación de acetyl-CoA y oxalacetato (OAA) para producir citrato (Figura 8). La oxidación del citrato genera equivalentes reductores que se emplean en la producción de ATP a través de la OXPHOS y con cada ciclo se liberan dos carbonos en forma de CO₂ que contribuyen a regenerar el OAA. Ante un defecto del funcionamiento de la vía, el OAA se vuelve sustrato limitante, por lo que tiene que abastecerse de rutas anapleróticas. La mayor parte proviene de la glutamina, que se convierte en glutamato gracias a la enzima glutaminasa, y a través de reacciones involucradas en la síntesis de nucleótidos. El glutamato pasa a α -cetoglutarato (α KG, del inglés *α -ketoglutarate*) por medio de dos reacciones, una por transferencia del grupo amino del glutamato a un cetoácido, dando como resultado α KG y un aminoácido. Y el otro, donde el glutamato es desaminado por la glutamato deshidrogenasa (GDH), liberando amoníaco y produciendo α KG. El α KG sirve de sustrato en la síntesis de succinato a través de la ruta anterógrada del TCA, mientras que el GABA (del inglés *γ -aminobutyric acid*) obtenido a partir de glutamato también aumenta a nivel intracelular, participando en la síntesis de succinato a través de la vía que se conoce como **GABA shunt**¹⁴⁷⁻¹⁴⁹.

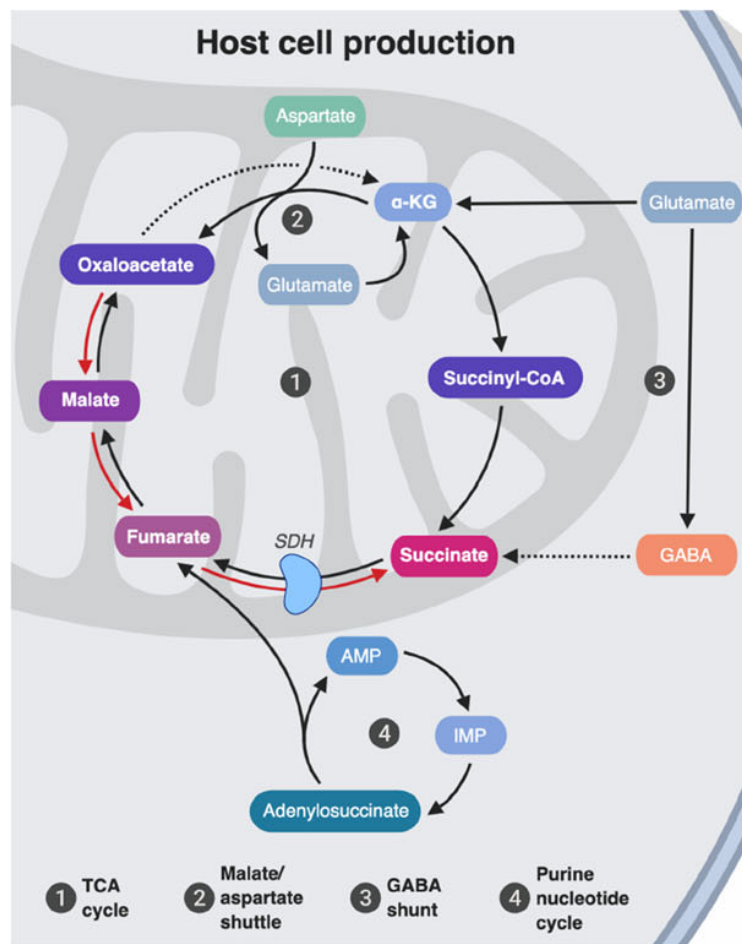


Figura 8. Vías involucradas en el aumento de succinato intracelular¹³³.

El succinato que se ha originado en grandes cantidades en la matriz de la mitocondria, es exportado desde el interior del orgánulo hacia el citosol de la célula gracias al transportador dicarboxílico SLC25A10 (del inglés, *solute carrier family 25 membrane 10*) que transporta también malato y fumarato¹³⁵ situado en la membrana interna; y a través de canales de aniones dependientes de voltaje (VDAC, del inglés *voltage-dependent anion channel*) en la membrana mitocondrial externa¹⁵⁰. Los niveles elevados de succinato en el citosol producen diversos efectos en la célula, dando lugar a modificaciones postransduccionales por medio de succinilización de proteínas, interviniendo en la regulación epigenética a través de mecanismos que involucran la metilación de del DNA y de histonas, y promoviendo la estabilización del factor HIF1 α que estimula la producción de IL-1 β , el programa proinflamatorio y la producción de ROS por parte de la célula^{126,135,146,149}.

Introducción

Cuando los niveles intracelulares de succinato son muy elevados, puede tener lugar su paso a nivel sistémico a través de transportadores de membrana plasmática, entre los descritos se encuentran los transportadores dicarboxílicos de aniones orgánicos (OAT, del inglés *organic anionic transporter*)¹⁵¹ y los transportadores monocarboxílicos (MCTs, del inglés *monocarboxylate transporters*)¹⁵². Los OAT pertenecen a la familia SLC22 y tienen un papel central en el transporte de pequeños metabolitos endógenos, fármacos y toxinas, principalmente en riñón e hígado¹⁵³. Funcionan como intercambiadores que median el transporte de aniones orgánicos hacia el interior de la célula a cambio del exporte de productos metabólicos a la sangre. Se han identificado y caracterizado funcionalmente varios subtipos de OAT^{154,155}, que difieren en función del tipo de sustrato, la distribución de tejidos y la regulación¹⁵⁶. Entre estos, OAT1-OAT3, OAT5 y OAT10 pueden intercambiar succinato en el cotransporte durante el intercambio de aniones orgánicos^{151,154,157}. Los MCTs son miembros de la familia SLC16 con 14 isoformas, algunas de las cuales catalizan el transporte de moléculas monocarboxiladas ligadas a protones¹⁵⁸. El succinato, en su forma monocarboxilada protonada puede ser un sustrato de transporte para la isoforma MCT1^{152,159-161}. Los niveles extracelulares de succinato son también regulados a través de ciertos transportadores de compuestos dicarboxílicos, más concretamente por miembros de la familia SLC13 (del inglés, *solute carrier family 13*), que favorecen la captación celular de succinato por parte de la célula. Un ejemplo sería el cotransportador-1 de Na⁺/dicarboxilato (NaDC1), codificado por el gen SLC13A2, que se expresa predominantemente en el riñón y el intestino¹⁶², donde lleva a cabo la reabsorción de los intermedios de TCA del filtrado tubular y de los alimentos digeridos, respectivamente. También está el cotransportador 3 de Na⁺/ dicarboxilato (NaDC3), que está codificado por el gen SLC13A3 y tiene una distribución tisular más amplia y una mayor afinidad para el succinato en comparación con NaDC1¹⁶³. Aunque con menor afinidad, el succinato también puede ser transportado por el cotransportador de Na⁺/citrato (NaCT), que es codificado por el gen SLC13A5 y se encuentra predominantemente en el hígado y el cerebro^{162,164}.

A nivel extracelular, los niveles elevados de succinato se consideran como una señal de alarma producida a partir de una situación de estrés metabólico, como sucede en determinados estados fisiológicos como sería el ejercicio físico intenso¹⁴³ y en el contexto de patologías como la obesidad^{165,166}, la HTA¹⁶⁵, la enfermedad coronaria¹⁶⁷ y la T2D^{139,165} entre otras. El succinato circulante puede actuar de forma similar a como lo hace una hormona, con efectos a nivel autocrino, paracrino y endocrino, a través de la interacción con su receptor SUCNR1 (del inglés, *succinate receptor 1*)¹⁶⁸, presente en la membrana celular de un amplia variedad de tipos celulares^{169,170}.

3.3. SUCNR1

SUCNR1, también conocido como GPR91 (del inglés *G-protein-coupled receptor 91*), es un receptor descubierto por primera vez en 1995 en una línea celular de megacariocitos humanos, que durante mucho tiempo se había clasificado como huérfano hasta que en 2004 se identificó por primera vez la molécula de succinato como su ligando específico¹⁶⁸. SUCNR1 forma parte de la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs, del inglés *G-protein-coupled receptors*), un grupo de receptores formados por siete dominios transmembrana (TMD, del inglés *transmembrane domain*) que se compone de siete hélices α . Su función se encuentra mediada por una gran variedad de estímulos extracelulares como son fotones, SCFAs, hormonas y neurotransmisores^{171,172}. Entre las principales localizaciones descritas en las que se expresa el receptor SUCNR1, se encuentran las células de la mácula densa del riñón, las células hepáticas estrelladas, las células ganglionares de la retina, los cardiomiocitos, los adipocitos, las células hematopoyéticas de la sangre y del sistema inmunitario como las células dendríticas y los macrófagos^{170,173,174}.

A nivel estructural, SUCNR1 presenta gran homología con la familia de receptores purinérgicos, y en concreto con el receptor P2Y1R (purinoreceptor 1) con el comparte alrededor del 29% de aminoácidos, lo que ha resultado muy útil en el estudio de su estructura, así como en la localización de los sitios específicos de unión a ligando¹⁷⁵. Como cualquier otro miembro de GPCRs,

SUCNR1 se puede diferenciar en tres regiones, la **porción extracelular** que regula el acceso y unión al ligando, la porción de **siete dominios transmembrana** que se ha mencionado con anterioridad, y la **porción intracelular** que se encarga de la transducción de señal a proteínas intracelulares efectoras como se esquematiza en la figura 9¹⁷².

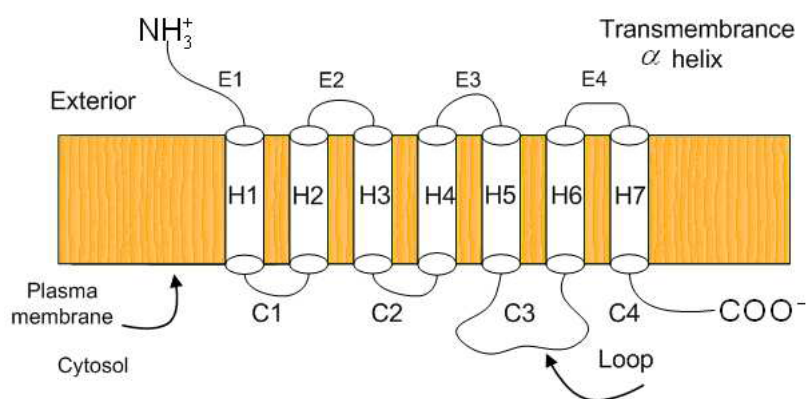


Figura 9. Esquema de la estructura de un GPCR¹⁷⁶.

La región extracelular contiene tres bucles extracelulares (ECLs, del inglés *extracellular loops*) y un extremo amino (N-) terminal, que contribuyen principalmente a dar lugar a sus dos conformaciones, activa o inactiva. La primera, es impermeable al agua y es la que permite el acceso a ligandos hidrofóbicos, y la segunda corresponde a una conformación inaccesible al ligando. Los ECLs parecen ser los responsables tanto de guiar al ligando en el proceso de unión, como de proporcionar estabilidad al receptor limitando los cambios conformacionales durante la misma. En el extremo N-terminal del receptor en humanos, se han descrito dos sitios de glicosilación en los residuos Asn8 y Asn162, que constituyen potenciales zonas de modificaciones postraduccionales¹⁷³. En cuanto al TMDs, este se encuentra altamente conservado y compartido con otros receptores purinérgicos. Como mediador de la unión receptor-ligando, las uniones no covalentes entre los 7 TMD mantienen la estructura del *core* en ambos estados (activado e inactivado), de forma que la red de uniones que tienen lugar en el TMD, junto con la interacción con el propio ligando, acaban por determinar la posición de las regiones que presentarán unión al ligando¹⁷³. A nivel intracelular, el receptor está constituido por otros tres bucles (ICLs, del inglés *intracellular loops*) y un extremo carboxilo (C-) terminal.

La principal función de esta región intracelular es la activación de efectores de vías de señalización *down-stream*. La fosforilación de esta región citoplasmática podría ser relevante en la especificidad de señales. En este sentido, se ha descrito un sitio de fosforilación en la Ser326 en SUCNR1, del que aún se desconoce la repercusión a nivel de regulación, función o estabilidad¹⁷³.

En cuanto a otros mecanismos de regulación de SUCNR1, recientemente se ha descrito la presencia de un polimorfismo de un único nucleótido (SNPs, del inglés *single nucleotide polymorphism*) que parece estar relacionado con la regulación de su expresión a la alza, y que se cree que incrementaría la funcionalidad del receptor, a través de la detección y mecanismos de acción frente a patologías relacionadas con estrés oxidativo¹⁷⁷.

En general, los mecanismos de regulación a los que se encuentran sujetos los GPCRs pueden resultar complejos, y en el caso particular de SUCNR1, a pesar de que se han identificado sitios de glicosilación y fosforilación en residuos específicos, como se ha mencionado anteriormente, se desconoce el impacto de estas modificaciones postraduccionales sobre la funcionalidad de dicho receptor. Asimismo, hay que tener presente la existencia de otros mecanismos de regulación que involucren cambios a nivel genético como se ha visto con los SNPs. Por lo que, en lo que respecta a la regulación de este receptor, aún queda mucho por investigar tanto a nivel de mecanismos reguladores como de impacto de estos en su funcionamiento.

3.3.1. Mecanismos de señalización

Al igual que en el caso de otros GPCRs, la transducción de la señal de SUCNR1 depende de una proteína G heterotrimérica, o proteína fijadora de nucleótidos de guanina, constituida por una subunidad de tipo $G\alpha$, una $G\beta$ y una $G\gamma$ ¹⁷¹. La subunidad $G\alpha$ puede unirse e hidrolizar GTP (del inglés *guanosine triphosphate*) en GDP (del inglés *guanosine diphosphate*) permitiendo el ciclo de inactivación-activación de la proteína G. En el estado inactivo GDP se une a la subunidad $G\alpha$ y se asocia al dímero $G\beta\gamma$. Cuando el receptor es activado, GTP desplaza a GDP y la subunidad $G\alpha$ se disocia del dímero $G\beta\gamma$ (Figura 10)¹⁷¹.

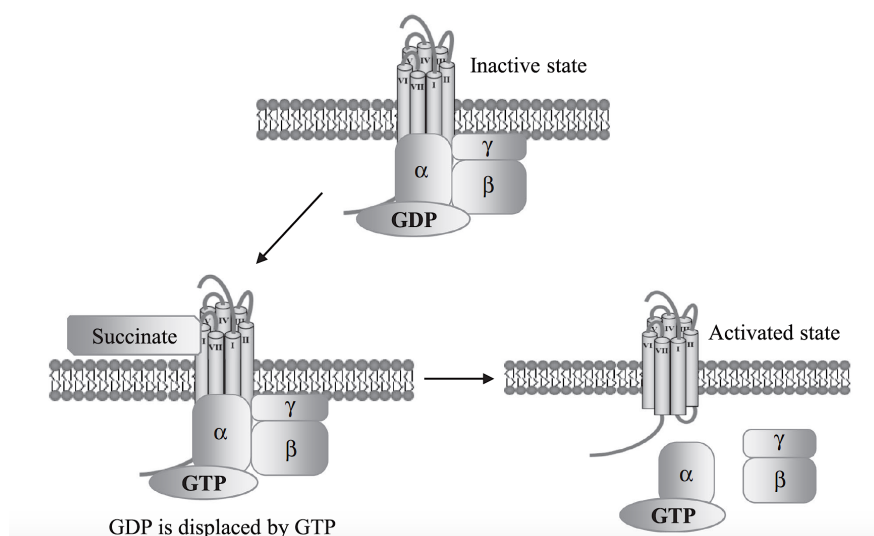


Figura 10. Estado de activación-inactivación de la proteína G asociada a GPCR¹⁷³.

Tanto $G\alpha$ como el dímero $G\beta\gamma$ son capaces de inducir vías de señalización, entre las cuales se encuentran la vía de la adenilato ciclasa (AC)-AMPc (adenosín monofosfato cíclico) y la de la fosfolipasa C (PLC, del inglés *phospholipase-C*)-IP₃ (del inglés *inositol 1,4,5-trisphosphate*), DAG (diacilglicerol)¹⁷⁸. Las diferentes subunidades α , β y γ así como sus combinaciones, son quienes conforman los múltiples y selectivos mecanismos de señalización. A su vez, las proteínas G se divide en 4 familias de acuerdo con la función que lleva a cabo la subunidad $G\alpha$, de forma que la $G\alpha_s$ activa AC, $G\alpha_{i/o}$ inhibe AC e interacciona con otros efectores, $G\alpha_{q/11}$ que activa PLC β y por último $G\alpha_{12/13}$ que regula proteínas pequeñas de unión a GTP. A su vez, la liberación del dímero $G\beta\gamma$ permite la interacción con otras moléculas de señalización, como es la activación de la fosfatidil inositol 3 kinasa (PI3K) que fosforila a la proteína kinasa B (PKB), también conocida como AKT, un importante mediador celular¹⁷⁸.

A partir de las funciones descritas para este receptor, se puede inferir que la interacción succinato-SUCNR1 parece estar desencadenando diferentes mecanismos de señalización que resultan en una gran variedad de funciones que involucran multitud de tipos celulares y tejidos, como se puede apreciar en la tabla 1^{169,170,173,174,179}.

Introducción

Ruta	Tipo celular	Efecto	Referencia
Ca ²⁺	Células del endotelio glomerular	Síntesis y liberación de NO y PGE ₂	Schnermann et al., 2008
PI3Kβ / Akt1 y quinasa Src	Plaquetas humanas	Agregación plaquetaria	Högberg et al., 2010
MEK/ERK1/2 y CaMKIIδ/HDAC5	Cultivos primarios de cardiomiocitos de ratas neonatales	Hipertrofia de cardiomiocitos	Aguar et al., 2014
Dependiente de PGE ₂	Astroцитos	Expresión de factores proangiogénicos (Vegf, Ang1, Ang2); citoquinas proinflamatorias (IL-1b, IL6); incrementa PGE ₂	Hamel et al., 2014.
ERK1 / 2, JNK y p38 MAPK	Línea celular ganglionar de la retina, RGC-5	Secreción de VEGF y proliferación de células endoteliales. Retinopatía diabética.	Hu et al., 2015
PI3K / Akt	Cardiomiocitos de rata neonatal	Hipertrofia ventricular inducida por sobrecarga de presión	Yang et al., 2016
Erk/Akt	Línea celular de músculo esquelético murino C2C12	Síntesis de proteínas del músculo esquelético	Yuan et al., 2017
ERK1 / 2, C / EBP β, c-Fos y HIF-1α	Células ganglionares de la retina	Regulación de la expresión de VEGF en la retinopatía hipóxica.	Li et al., 2017
ERK/STAT3	Células endoteliales (hUVEC)	Promueve la angiogénesis tumoral y la progresión del cáncer	Mu et al., 2017
Akt/mTor/FoxO	Línea celular del músculo esquelético murino C2C12	Deposición de proteínas en miotubos C2C12	Yuan et al., 2017
PKC ζ / p38 MAPK	Células madre mesenquimales humanas (hMSC)	Migración de hMSC a través de la fosforilación de DRP1 que interviene en la regeneración del tejido lesionado	Ko et al., 2017
PKC/MAPK (ERK y JNK)	Células uroteliales	Impulsan la proliferación de células uroteliales. Síndrome de la vejiga hiperactiva.	Mossa et al., 2017
cAMP-PKA	Cultivo primario de adipocitos humanos marrón y blanco	Activación de termogénesis en TA	Mills et al., 2018
HIF-1α / VEGF	Células endoteliales aórticas primarias de rata (RAEC)	Angiogénesis sinovial en artritis reumatoide	Li et al., 2018
NF-κB	Células mononucleares de sangre periférica humana (PBMCS)	Patogenia de la úlcera de Mooren	Li et al., 2018
α-SMA	Células estrelladas hepáticas (HSC)	Proliferación y migración de HSC. Inhibición de la apoptosis	Park et al., 2018
PKCδ y ERK1 / 2	Cardiomiocitos murinos	Tras isquemia cardiaca: Fisión mitocondrial, disfunción mitocondrial y apoptosis de cardiomiocitos	Lu et al., 2018
P-p38 MAPK	Células madre neurales murinas	Incrementa el consumo de succinato, transportadores Slc13A3/5 y Ptg2 y liberación de PGE ₂	Peuzzoti-Jametti L et al. 2018.
HIF-1α	Células epiteliales intestinales inflamadas	Promueven la función de barrera epitelial y disminuyen la apoptosis epitelial	Connors et al., 2019
STAT-3, NF-κβ y α-SMA	Fibroblastos primarios aislados de tejido intestinal de pacientes con Enfermedad de Crohn	Fibrosis en el tejido intestinal humano	Macias-Ceja et al., 2019
PI3K / AKT / HIF-1α	Células cancerosas de pulmón	Polarización de macrófagos y metástasis del cáncer	Jing-Yiing et al., 2020
Wnt	Células del epitelio intestinal (HT29 cells)	Activación del proceso EMT (transición epitelio-mesenquimal) y formación de fístulas en enfermedad de Crohn	Ortiz-Masiá et al., 2020
PI3K-HIF-1a	TAM (macrófagos asociados a tumor)	Metástasis tumoral vía IL-6	Wu et al., 2020.

Tabla 1. Vías de señalización descritas para SUCNR1.

3.3.2. SUCNR1 e inflamación

SUCNR1 se expresa en **progenitores hematopoyéticos** humanos (HPCs, del inglés *human hematopoietic progenitor cells*), donde se le ha atribuido función en el mantenimiento y regeneración del *pool* celular¹⁸⁰, así como también en **megacariocitos** y **eritroblastos**, precursores de plaquetas y eritrocitos respectivamente. Dentro de las células del **sistema inmunitario**, está presente tanto en las que corresponden al sistema innato: células dendríticas (DCs, del inglés *dendritic cells*), mastocitos y fagocitos mononucleares (que incluye a los macrófagos); así como en las del sistema adaptativo: linfocitos T y B¹⁷⁴.

La señalización mediada por SUCNR1, así como sus efectos, se han estudiado principalmente en el contexto del **sistema inmunitario innato**, concretamente en DCs y macrófagos. Este receptor resulta esencial para la activación de la **DC** por parte del succinato, donde se ha comprobado que la ausencia de SUCNR1 afecta a su actividad secretora y de migración¹³⁷. Además, se ha visto que su efecto sobre la producción de citoquinas proinflamatorias en células humanas, se ve reforzado por la activación de receptores TLR (del inglés *toll-like receptor*)-3 y TLR-7¹³⁷, que son receptores que reconocen patrones moleculares conservados de agentes patógenos infecciosos. A nivel del **macrófago**, la activación de SUCNR1 se ha relacionado con el desarrollo de procesos autoinmunes, como la artritis reumatoide¹³⁸ y la enfermedad inflamatoria intestinal¹⁸¹. Y, a pesar de que durante mucho tiempo se había considerado a esta vía como una inductora del fenotipo proinflamatorio en estas células, cabe considerar que estos estudios se basaban en macrófagos que habían sido activados previamente hacia un fenotipo proinflamatorios^{138,175}. En relación a la actividad quimiotáctica de SUCNR1 los datos resultan controvertidos, ya que si bien se observó que la depleción de SUCNR1 *in vivo* interfería en la capacidad migratoria de los macrófagos, los resultados *in vitro* no pudieron corroborar estos datos, al no detectar diferencias entre células deficientes en SUCNR1 y derivadas de ratón control^{139,182}. Por otro lado, también se relacionó de forma contradictoria el incremento en la expresión de este receptor en el macrófago, tanto con la estimulación con IL-1 β ¹³⁸, como con las citoquinas antiinflamatorias IL-4 o IL-13¹⁷⁵. Finalmente, los resultados derivados

de esta tesis (ver artículo 1 del apartado resultados) junto a otros recientes han supuesto un cambio de paradigma en relación al efecto inflamatorio de SUCNR1 en los macrófagos, en el que por un lado su ausencia se asocia a un incremento en la expresión de genes inflamatorios¹⁸³, y por otro, su activación se involucra en la inmunomodulación de otros procesos como la inflamación en el SNC¹⁸⁴ y la inflamación crónica y aguda (nuestro trabajo), así como también en la inducción de genes antiinflamatorios^{182,184}. Por lo que actualmente se cree que el succinato producido y liberado por células en condiciones de inflamación, podría actuar en un circuito de *feedback* regulando tanto mecanismos proinflamatorios como antiinflamatorios a nivel del macrófago¹⁷⁴.

3.3.3. SUCNR1 en el metabolismo

La interacción succinato SUCNR1 se ha relacionado con el desarrollo de diversas enfermedades, incluidas algunas comorbilidades relacionadas con la diabetes; como retinopatía diabética¹⁸⁵, nefropatía diabética¹⁸⁶ e HTA^{165,167}; la hipertrofia de los cardiomiocitos¹⁶⁷, la artritis reumatoide¹³⁸, la fibrosis hepática^{187,188}, la enfermedad inflamatoria intestinal¹⁸⁹, la degeneración macular asociada a la edad¹⁹⁰ y algunos tipos de cánceres¹⁸². También se ha investigado su función en cuanto a otros procesos como el papel antilipolítico en el TA^{191,192} y la inducción de la hematopoyesis¹⁸⁰ y el efecto antiinflamatorio en células madre del sistema nervioso central¹⁸⁴ como ya se ha mencionado. En dichas condiciones, se ha observado un aumento de succinato desde unos niveles considerados basales, descritos para humanos en el rango de 2-3 μM en suero y 2-20 μM en plasma^{136,168}, hasta unos niveles que rondan el perfil de activación de su receptor, presentando el succinato unos valores de concentración media efectiva (EC_{50}) en humanos de $56 \pm 8 \mu\text{M}$ ¹³⁶.

Hasta hace pocos años la activación de SUCNR1 se había relacionado exclusivamente con condiciones patológicas, excepto por su papel en la vascularización de la retina durante el desarrollo¹⁹³, y no parecía guardar relación con funciones de tipo fisiológicas para el organismo. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que en condiciones fisiológicas como el ejercicio^{151,194} y los estados posprandiales¹⁹⁵ tiene lugar un incremento de los niveles de succinato,

que podría cumplir efectos similares al de las hormonas. De hecho, a partir de la evidencia actual se puede inferir que el succinato además de actuar como sensor de daño tisular, también puede estar cumpliendo funciones como factor metabólico en la regulación de la homeostasis energética, de una forma específica en tejidos. Entre las localizaciones en las que se ha descrito que succinato y/o SUCNR1 actúan como reguladores potenciales de los procesos metabólicos encontramos: el riñón, el páncreas, el TA, el intestino, el hipotálamo y el músculo esquelético.

En el **riñón** SUCNR1 se expresa de forma abundante en la luz vascular del aparato yuxtglomerular (JGA, del inglés *juxtaglomerular apparatus*) y en los túbulos renales^{196,197}. Junto con la identificación del succinato como ligando natural de SUCNR1, se proporcionó la primera evidencia de succinato como estimulador de la presión arterial a través de la activación del sistema renina-angiotensina (RAS, del inglés *renin angiotensin system*) inducida por SUCNR1¹⁶⁸. Posteriormente, otro estudio demostró que el succinato circulante se encontraba elevado en ratas hipertensas¹⁶⁵ aunque los resultados no pudieron replicarse en sujetos humanos, cabe destacar que todos los participantes del estudio presentaban enfermedad arterial previa documentada¹⁶⁵. En cuanto a la activación inapropiada del sistema RAS en situación de diabetes, se han llevado a cabo diversos estudios^{186,198,199} con intención de encontrar los mecanismos reguladores implicados. Así, algunos de estos estudios respaldan la hipótesis de que el succinato podría desempeñar un papel central en la nefropatía diabética como un factor estresante de señalización. Sin embargo, la detección de niveles reducidos de renina en el riñón de ratones control SUCNR1^{-/-} no diabéticos, sugiere que la señalización de succinato-SUCNR1 podría comportar también un mecanismo fisiológico en el control de la actividad del sistema RAS¹⁸⁶.

A nivel de **páncreas**, hay estudios que describen que los ésteres metílicos de succinato que se hidrolizan de forma intracelular a succinato, presentan propiedades casi tan efectivas como las de la propia glucosa en la acción secretagoga sobre la insulina²⁰⁰. De hecho, estos compuestos son ampliamente utilizados a nivel experimental para estimular a las mitocondrias e inducir la liberación de insulina. Aunque los mecanismos subyacentes a este efecto siguen

sin estar claros, las propiedades insulínótropas del succinato, parecen estar relacionadas con su papel como sustrato de varias enzimas, que permiten la producción de energía así como de una variedad de factores como el mevalonato, que es importante para la liberación de insulina²⁰⁰. Se sabe que cuando se activa la liberación de insulina, hay una regulación positiva de la biosíntesis de proinsulina para reponer las reservas de dicha hormona. Bajo este escenario, el succinato se ha revelado como el único metabolito del TCA que estimula la biosíntesis de proinsulina independientemente de la secreción de insulina^{201,202}. De hecho, se ha descrito al succinato como el metabolito del TCA que se asocia de forma más positiva con la secreción de insulina de segunda fase²⁰³. Aunque por el momento se desconocen los mecanismos por los que succinato es capaz de regular la secreción de insulina, cabe considerar la posible implicación de la vía mediada por su receptor SUCNR1.

El **tejido adiposo blanco**, más concretamente los adipocitos purificados, expresan abundante cantidad de SUCNR1^{191,192}. Se ha demostrado que el succinato inhibe la lipólisis en el adipocito de forma dependiente de la toxina pertussis¹⁹², infiriendo así que los efectos antilipolíticos del succinato a través de su receptor se encuentran mediados por una proteína G de tipo inhibitoria (Gi). Esta acción antilipolítica ejercida por la vía succinato-SUCNR1 fue posteriormente confirmada por otro estudio, empleando explantes de TA de ratones SUCNR1^{-/-} totales¹⁹¹. Por otro lado, se sabe que la lipólisis en el TA está estrictamente regulada por hormonas que se secretan de acuerdo con el estado nutricional. De modo que en situación posprandial la actividad lipolítica del WAT es mínima gracias a la acción antilipolítica que ejerce la insulina. Dicho mecanismo concuerda con el aumento en los niveles circulantes de succinato observados tras la ingesta¹⁹⁵ que podrían tener un papel semejante al de la insulina.

Hasta el momento se desconoce la función que puede ejercer SUCNR1 en el adipocito marrón, aunque al parecer la expresión en **BAT** parece encontrarse reducida en comparación al WAT^{191,192}. Por otra parte, el succinato se ha descrito como un metabolito de señalización intracelular con actividad en la regulación de la fisiología del BAT, identificándose como una molécula termogénica. Además, se ha demostrado que la exposición al frío provoca un incremento de

los niveles sistémicos de succinato que son rápidamente metabolizados por los adipocitos marrones para impulsar la termogénesis a través de la producción de ROS²⁰⁴. Otro estudio más reciente revela que el succinato podría actuar como un inductor de la adipogénesis beige en progenitores de adipocitos blancos²⁰⁵. Por lo que, se ha propuesto el uso de suplementos dietéticos de succinato con el fin de aumentar el gasto energético y proteger así de la obesidad inducida por la dieta^{204,205}. Sin embargo, parece ser que el succinato administrado en la dieta no sería eficaz en revertir las consecuencias metabólicas adversas de la obesidad una vez que esta se ha establecido²⁰⁶.

En el **intestino**, se ha demostrado que al igual que sucede con otros compuestos orgánicos como el butirato y el propionato, el succinato derivado de la microbiota mejora el metabolismo de la glucosa a nivel intestinal. Gracias a un estudio reciente, se determinó que los fructooligosacáridos dietéticos inducen beneficios metabólicos de manera dependiente de la gluconeogénesis intestinal (GNI)²⁰⁷ aumentando el succinato en el ciego. Como resultado, se vió que el succinato de la dieta mejoraba la tolerancia a la glucosa en el ratón control, pero no en aquellos deficientes en glucosa-6-fosfatasa a nivel intestinal, una enzima que es clave en la producción de glucosa endógena, demostrando que la mejora mediada por el succinato es dependiente de la GNI. Otro estudio en el que se empleó glucosa marcada, demostró que el intestino es capaz de convertir succinato en glucosa, produciendo un efecto negativo en la gluconeogénesis hepática²⁰⁸. De acuerdo con esto, la colonización de ratones con microorganismos productores de succinato aumenta el succinato cecal e inhibe la producción de glucosa hepática^{208,209}. De hecho, se ha sugerido que el succinato derivado de la microbiota podría actuar en la regulación de algunas enzimas de la GNI²⁰⁹. Estos estudios evidencian por primera vez un efecto beneficioso del succinato derivado de la microbiota a nivel de metabolismo²⁰⁸.

El **hipotálamo** se considera uno de los principales órganos encargado de la regulación de la homeostasis energética, a través de la modulación de la ingesta de alimentos y del propio gasto energético. En ese sentido, se ha propuesto que el succinato podría jugar un papel clave en la respuesta hipotalámica a la adaptación metabólica durante el proceso de envejecimiento²¹⁰, dado su papel como sensor de O₂ en la mitocondria

Introducción

involucrado en la producción de ROS. Si bien se desconoce si SUCNR1 se expresa en hipotálamo, un estudio reciente demostró que la administración de succinato en esta localización aumenta la expresión de HIF y suprime la ingesta de alimentos²¹¹. Además, se ha estudiado que ratones deficientes globales de SUCNR1^{-/-} presentan una incrementada ingesta de alimentos¹⁹¹, aunque resta por determinar si esto es debido a una acción indirecta de la deficiencia del receptor en otros tejidos, o a un papel intrínseco como sensor de nutrientes a nivel del hipotálamo. Se sabe que SUCNR1 se expresa en otras áreas del cerebro²¹², principalmente en neuronas corticales y astrocitos²¹³ donde al parecer se encuentra regulado por los niveles de O₂^{213,214}.

La acumulación de succinato en el **músculo esquelético** es uno de los hallazgos más antiguos en relación a un contexto no patológico, y proviene de estudios en los que se comprobó que el ejercicio anaeróbico produce aumento de los niveles de succinato circulante¹⁴³. Recientemente se ha demostrado que el succinato y el SUCNR1 constituyen componentes clave en la regulación de la remodelación de la fibra muscular esquelética. Se ha observado que el succinato es capaz de restaurar el consumo de oxígeno en el músculo esquelético en un entorno patológico asociado con disfunción mitocondrial²¹⁵. Y que el ejercicio induce un patrón de secreción de metabolitos específicos en el músculo esquelético, caracterizado entre otros, por un aumento de succinato que se relacionó con una mejora en la sensibilidad a la insulina²¹⁶. También se ha demostrado que el succinato administrado en la dieta en ratones no obesos aumenta la capacidad de resistencia al ejercicio a través de la biosíntesis mitocondrial por un mecanismo dependiente de SUCNR1²¹⁷. Más recientemente, se ha confirmado que tanto el músculo humano como el de ratón secretan succinato durante el ejercicio mediante un mecanismo dependiente del transportador MCT-1, que a su vez es muy sensible a los cambios de pH. Este estudio también apoya un modelo por el cual el succinato liberado durante el ejercicio media la adaptación muscular a través de SUCNR1, pero al contrario del estudio anterior, atribuyen estas adaptaciones a otras células residentes en tejido como por ejemplo las poblaciones de células endoteliales y satélites¹⁵². Sorprendentemente, el aumento de la actividad muscular va seguido de la acumulación de grandes cantidades de succinato en la sangre arterial, junto con

Introducción

un aumento del flujo hepatoesplácnico²¹⁸. Resultados que sugieren que el succinato podría actuar como un agente regulador de la respuesta hepática al ejercicio, adaptándose a las demandas de energía a través de la producción de glucosa hepática y la oxidación de grasas. Por ello, a pesar de que se ha propuesto el uso de succinato como suplemento dietético para aumentar el rendimiento y contrarrestar la fatiga. Resulta imprescindible comprender los mecanismos que involucran a este eje antes de proponer a dicho metabolito como terapia.

En conclusión, resulta indiscutible el amplio papel que presenta el succinato y su receptor SUCNR1 en la fisiopatología de diferentes enfermedades, así como en el mantenimiento de procesos fisiológicos implicados en la homeostasia metabólica. Por este motivo, desde el descubrimiento de la estructura cristalizada de SUCNR1 en 2004 se ha incrementado el interés en el estudio de moléculas con potencial afinidad para sitios de unión a este receptor, con el fin de poder establecer en un futuro estrategias de intervención terapéutica para combatir patologías en las que se ha visto involucrado a este receptor.

En este sentido, se han descubierto **agonistas** de SUCNR1 a partir de análogos no metabolitos con estructura semejante al succinato, como son el ácido cis-cyclopropano-1,2-dicarboxílico y el ácido cis-epoxy-succínico²¹⁹, aunque con una potencia variable en torno al 50 y el 90%¹⁷⁵. En cuanto a **antagonistas**, antes de que se publicara la estructura del receptor, se habían descrito algunos que no presentaban relación estructural con el succinato¹⁶⁹. Pero tras el descubrimiento de su estructura, surgió el NF-56-EJ40²²⁰ como molécula antagonista selectiva del receptor humano. Respecto a la interacción de estas moléculas con el receptor, hay que tener en cuenta la presencia de ligeras variaciones, ya que aunque los sitios específicos de unión al ligando se localizan en el mismo dominio proteico, en ocasiones no comparten exactamente los mismos sitios de unión que se corresponden con los de su ligando natural el succinato.

Finalmente, cabe remarcar que si bien se ha avanzado mucho en los últimos años en el conocimiento de las implicaciones metabólicas que presenta el succinato y el SUCNR1 en el organismo como se ha ido viendo a lo largo de

Introducción

la presente tesis doctoral, aún estamos lejos de conocer por completo su funcionalidad y los mecanismos de acción en los que se ve involucrado. Por lo que, en estos momentos resulta prematuro pensar en el uso de agonistas o antagonistas como herramienta terapéutica dirigidas al receptor SUCNR1. No obstante, cabe destacar la importancia del avance en el estudio de dichas moléculas como herramienta valiosa de cara a contribuir a una mayor comprensión de los mecanismos implicados en la regulación de esta vía en los diferentes tejidos.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El succinato es un metabolito del TCA con funciones señalizadoras, cuya producción se ve incrementada en situaciones de estrés celular. En estas condiciones, se produce un eflujo del mismo hacia el exterior celular, siendo capaz de alcanzar el umbral de activación de su receptor SUCNR1. Entre las numerosas localizaciones descritas para este receptor, nos hemos interesado en el TA y las células del sistema inmunitario, por la demostrada relación que existe entre la inflamación y el desarrollo de la patología metabólica.

Entre las funciones que se habían descrito para esta vía, el conocimiento se limitaba a la inhibición de la lipólisis en el adipocito maduro y la activación de la respuesta inflamatoria en células inmunes. A nivel intracelular el succinato era considerado como una señal inflamatoria capaz de activar al factor de transcripción HIF-1 α , la expresión de la citoquina proinflamatoria IL-1 β , así como de mediar procesos epigenéticos. Mientras que el incremento a nivel extracelular, se había descrito principalmente en modelos de animales de obesidad y de patologías relacionadas con un riesgo CV incrementado como la HTA, la retinopatía diabética, la nefropatía diabética y la enfermedad cardíaca isquémica; así como también en la potenciación de la respuesta inflamatoria de la inmunidad mediada por células dendríticas.

En este contexto, nuestra **hipótesis** se basa en que la vía succinato-SUCNR1 en macrófagos podría contribuir de forma relevante en el desarrollo de la fisiopatología de la obesidad y la T2D, como mecanismo implicado en la respuesta metabólica inflamatoria subyacente a dichos estados. Así como también, nos planteamos el posible uso de los niveles circulantes de succinato como posible biomarcador indicativo del estado metabólico e inflamatorio del paciente, en la búsqueda de nuevas herramientas clínicas aplicables al manejo de la enfermedad metabólica.

Hipótesis y objetivos

Por lo tanto, el **objetivo general** de la presente tesis doctoral es estudiar el papel del eje succinato-SUCNR1 en la respuesta inmunometabólica asociada a la obesidad y la T2D.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS DEL ESTUDIO 1

Indagar en los mecanismos celulares y moleculares implicados en la respuesta inflamatoria mediada por el receptor SUCNR1 a nivel del macrófago y en el contexto de patología metabólica, a través de un modelo de ratón *knockout* específico del receptor en la línea celular mieloide.

Objetivos intermedios

- Estudiar el impacto a nivel metabólico de la delección específica de SUCNR1 en la línea mieloide, en un contexto de dieta estandar y de dieta rica en grasa.
- Estudiar el fenotipo y perfil molecular de los macrófagos residentes de TA del modelo específico deficiente en SUCNR1.
- Determinar la capacidad de polarización de macrófagos deficientes en SUCNR1, en presencia de estímulos clásicos.
- Indagar en la vía de señalización involucrada en la activación de SUCNR1 en el macrófago.
- Evaluar el efecto global de la delección específica de SUCNR1 ante una situación de estrés metabólico aguda como es la exposición al frío.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS DEL ESTUDIO 2

Evaluar la funcionalidad del succinato basal como un biomarcador del estatus metabólico del organismo y su capacidad de actuar como factor predictor independiente de remisión de T2D tras cirugía bariátrica.

Objetivos intermedios

- Determinar si los niveles circulantes de succinato guardan relación con el estado metabólico del paciente obeso mórbido, a través del estudio de su correlación con determinados parámetros clínicos.
- Comparar los niveles de succinato basales y tras uno año de la cirugía, entre pacientes que presentaron remisión de T2D y los que no la presentaron.
- Determinar la asociación entre los niveles de succinato basales y los grupos remisión y no remisión de T2D, tras uno y dos años de la cirugía.
- Establecer el porcentaje de pacientes que continuaba en remisión al cabo de 2 años de cirugía, así como su relación con los niveles basales de succinato.
- Investigar la asociación entre niveles de succinato basales y el éxito en la remisión de T2D en función del tipo de cirugía.

RESULTADOS

RESULTADOS

Artículo 1

SUCNR1 controls an anti-inflammatory program in macrophages to regulate the metabolic response to obesity.

Keiran N, Ceperuelo-Mallafré V, Calvo E, Hernández-Alvarez MI, Ejarque M, Núñez-Roa C, Horrillo D, Maymó-Masip E, Rodríguez MM, Fradera R, de la Rosa JV, Jorba R, Megia A, Zorzano A, Medina-Gómez G, Serena C, Castrillo A, Vendrell J, Fernández-Veledo S.

Nat Immunol. 2019 May;20(5):581-592. doi: 10.1038/s41590-019-0372-7. Epub 2019 Apr 8.

Artículo 2

Preoperative circulating succinate levels as a biomarker for diabetes remission after bariatric surgery.

Ceperuelo-Mallafré V, Llauradó G, **Keiran N**, Benaiges E, Astiarraga B, Martínez L, Pellitero S, González-Clemente JM, Rodríguez A, Fernández-Real JM, Lecube A, Megia A, Vilarrasa N, Vendrell J, Fernández-Veledo S.

Diabetes Care. 2019 Oct;42(10):1956-1965. doi:10.2337/dc19-0114. Epub 2019 Aug 2. Erratum in: Diabetes Care. 2019 Dec;42(12):2347.

Resultados

SUCNR1 controls an anti-inflammatory program in macrophages to regulate the metabolic response to obesity

Noelia Keiran^{1,2,11}, Victoria Ceperuelo-Mallafre^{1,2,11}, Enrique Calvo^{1,2},
Maria Isabel Hernández-Alvarez^{1,2,3}, Miriam Ejarque^{1,2}, Catalina Núñez-Roa^{1,2}, Daniel Horrillo⁴,
Elsa Maymó-Masip^{1,2}, M. Mar Rodríguez^{1,2}, Rosa Fradera⁵, Juan Vladimir de la Rosa^{6,7}, Rosa Jorba⁸,
Ana Megia^{1,2}, Antonio Zorzano^{2,3,9}, Gema Medina-Gómez⁴, Carolina Serena^{1,2}, Antonio Castrillo^{6,7},
Joan Vendrell^{1,2,10,12*} and Sonia Fernández-Veledo^{1,2,12*}

Succinate is a signaling metabolite sensed extracellularly by succinate receptor 1 (SUCNR1). The accumulation of succinate in macrophages is known to activate a pro-inflammatory program; however, the contribution of SUCNR1 to macrophage phenotype and function has remained unclear. Here we found that activation of SUCNR1 had a critical role in the anti-inflammatory responses in macrophages. Myeloid-specific deficiency in SUCNR1 promoted a local pro-inflammatory phenotype, disrupted glucose homeostasis in mice fed a normal chow diet, exacerbated the metabolic consequences of diet-induced obesity and impaired adipose-tissue browning in response to cold exposure. Activation of SUCNR1 promoted an anti-inflammatory phenotype in macrophages and boosted the response of these cells to type 2 cytokines, including interleukin-4. Succinate decreased the expression of inflammatory markers in adipose tissue from lean human subjects but not that from obese subjects, who had lower expression of SUCNR1 in adipose-tissue-resident macrophages. Our findings highlight the importance of succinate-SUCNR1 signaling in determining macrophage polarization and assign a role to succinate in limiting inflammation.

Traditionally considered an energetic metabolite of the mitochondrial tricarboxylic acid cycle, succinate has recently emerged as a metabolic signal governing local stress, tissue damage and immunologic danger^{1–4}. Thus, in certain activated innate immune cells or in cells relying on anaerobic glycolysis in hypoxia, the amount of mitochondrial succinate increases⁵ and is then released into the cytosol, where its accumulation is directly related to protein succinylation, stabilization of the transcription factor HIF-1 α , epigenetic regulation and reactive oxygen species production^{1,3,5}.

Succinate can also be released to the extracellular space through plasma-membrane transporters of the SLC13 family, by poorly understood processes^{4,6}. Elevated amounts of circulating succinate occur in some physiological conditions, such as endurance exercise⁷ and in certain pathologies, including hypertension⁸, ischemic heart disease⁹, type 2 diabetes mellitus^{8,10} and obesity^{8,11}. Extracellular succinate binds its receptor succinate receptor 1 (SUCNR1, also known as GPR91)¹² on the plasma membrane of a broad range of cells^{13,14}. To date, activation of SUCNR1 by extracellular succinate has been associated with pathological cardiomyocyte hypertrophy⁹, normal retinal development and proliferative ischemic retinopathy¹⁵, pathogenesis of diabetic nephropathy by activating renin-angiotensin

system^{4,6,16}, hepatic fibrosis through activation of α -SMA production in stellate cells¹⁷ and adipose tissue expansion by SUCNR1-dependent antilipolytic effects in adipocytes¹⁸, among others.

The succinate-SUCNR1 signaling axis has a complex role in immune responses^{19,20}. Dendritic cells sense immunological danger through SUCNR1, to enhance antigen-presenting functions required for optimal immune activation^{2,21}. Further, the absence of SUCNR1 produces a hyperactive mast cell phenotype²². While succinate is known to be released by lipopolysaccharide (LPS)-activated pro-inflammatory macrophages²³, the role of SUCNR1 in macrophage plasticity remains largely unknown. Thus, despite early reports that SUCNR1 activation boosts pro-inflammatory responses in macrophages during antigen-induced arthritis²³, SUCNR1-deficient peritoneal macrophages have a similar cytokine profile as those derived from wild-type animals, both in basal and in LPS-stimulated conditions¹⁰. Moreover, recent reports showed that extracellular succinate might also mediate anti-inflammatory responses in neural stem cells²⁴. Indeed, SUCNR1 has been described as a major driver of microbiota-triggered type 2 immunity in the intestine²⁵.

There is strong evidence that succinate-SUCNR1 signaling serves as a link between metabolic stress and inflammation;

¹Unitat de Recerca, Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, Institut d' Investigació Sanitària Pere Virgili, Tarragona, Spain. ²CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain. ³Institute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona), The Barcelona Institute of Science and Technology, Barcelona, Spain. ⁴Departamento de Ciencias Básicas de la Salud, Área de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad Rey Juan Carlos, Madrid, Spain. ⁵General and Digestive Surgery Service, Hospital St. Pau i Sta Tecla, Institut d' Investigació Sanitària Pere Virgili, Tarragona, Spain. ⁶Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" CSIC-UAM, Madrid, Spain. ⁷Unidad de Biomedicina (Unidad Asociada al CSIC), Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitaria (IUBIS), Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas, Spain. ⁸General and Digestive Surgery Service, Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, Institut d' Investigació Sanitària Pere Virgili, Tarragona, Spain. ⁹Departament de Bioquímica i Biomedicina Molecular, Facultat de Biologia, Barcelona, Spain. ¹⁰Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain. ¹¹These authors contributed equally: Noelia Keiran, Victoria Ceperuelo-Mallafre. ¹²These authors jointly supervised this work: Joan Vendrell, Sonia Fernández-Veledo. *e-mail: jvo@comt.es; sonia.fernandezveledo@gmail.com

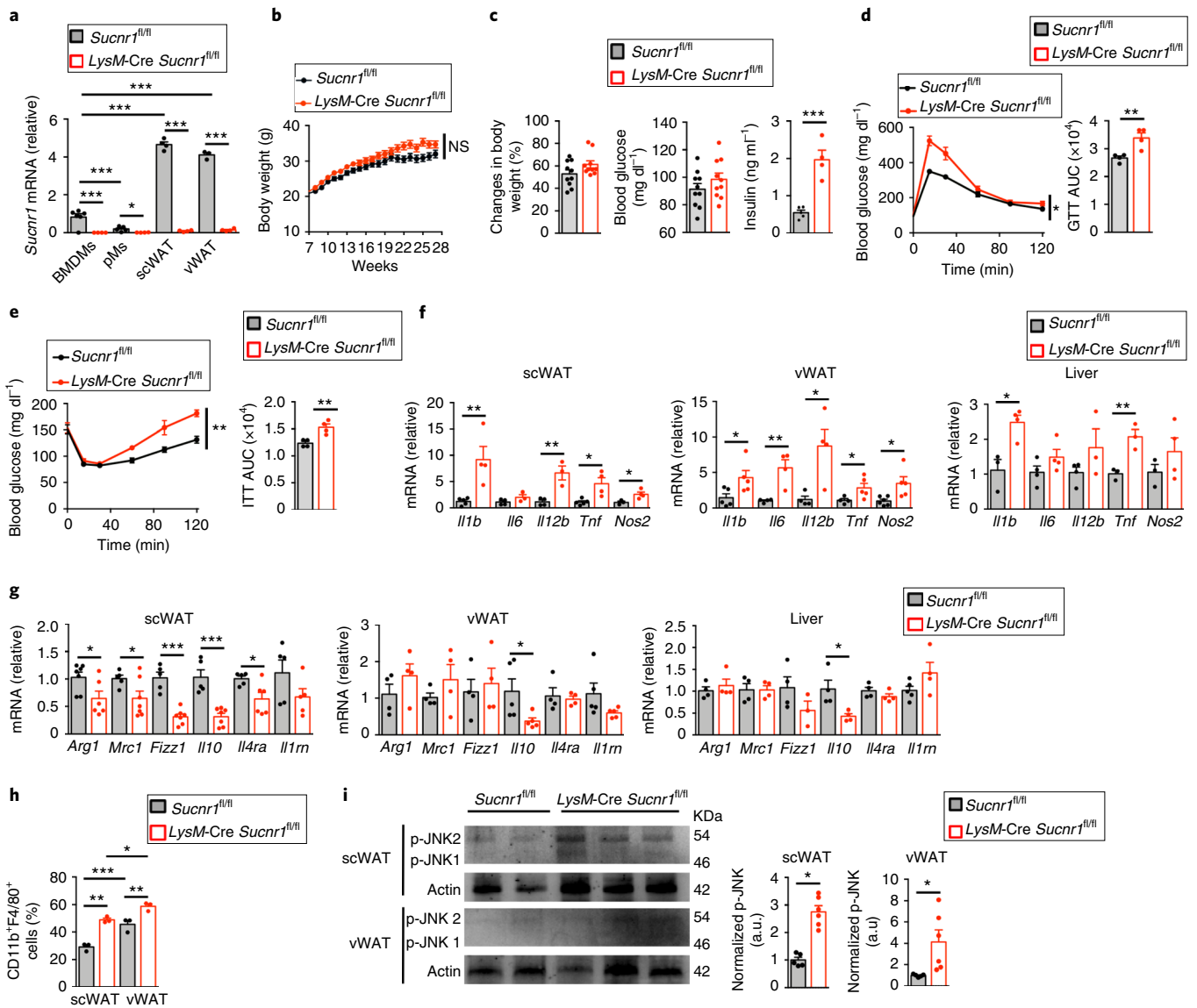


Fig. 1 | *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* mice fed a NCD show tissue inflammation and glucose intolerance. **a**, qPCR analysis of *Sucnr1* mRNA in BMDMs, peritoneal macrophages (pMs), scWAT ATMs and vWAT ATMs in *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* mice and age-matched *Sucnr1^{fl/fl}* littermates (BMDMs and peritoneal macrophages $n=5$ or 4 ; scWAT $n=4$; vWAT $n=3$ or 4 , for *Sucnr1^{fl/fl}* and *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* respectively; biologically independent samples). Results are transformed as $\log_2(\text{value} + 1)$ relative to BMDMs from *Sucnr1^{fl/fl}* mice, set as 1. **b**, Body weight progression. **c**, Changes in body weight and fasting serum glucose as in **a** from two independent experiments ($n=10$ mice). Serum insulin levels as in **a** ($n=5$ for *Sucnr1^{fl/fl}* and $n=4$ for *LysM-Sucnr1^{fl/fl}* mice). **d, e**, GTT (**d**), ITT (**e**) and their respective area under the curve (AUC) as in **a** ($n=4$ mice). **f, g**, qPCR analysis of pro-inflammatory (**f**; $n=6$ for *Sucnr1^{fl/fl}* and $n=5$ for *LysM-Sucnr1^{fl/fl}* mice) and anti-inflammatory genes (**g**; $n=7$ mice) as in **a** from two independent experiments. **h**, Abundance of CD11b⁺F4/80⁺ cells assessed by flow cytometry in scWAT and vWAT SVF ($n=3$ biologically independent samples). **i**, Immunoblot analysis of phosphorylated (p-)JNK1/2 protein. β -actin was used as a loading control. Representative image and densitometry analysis (a.u., arbitrary units) ($n=5$ per *Sucnr1^{fl/fl}* and $n=6$ per *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* biologically independent samples). Uncropped blots are provided in source data. All data are shown as mean \pm s.e.m.; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; NS, non-significant (two-tailed unpaired *t*-test in bar graphs and two-way analysis of variance in body-weight, GTT and ITT curves).

however, whether succinate can be regarded as a harmful signal or has a protective role remains controversial. Because obesity is associated with chronic inflammation, and because macrophages are central mediators in obesity-associated inflammation, here we used mice with conditional inactivation of *Sucnr1* in myeloid cells to investigate the role of succinate–SUCNRI signaling in obesity. We found that SUCNRI modulated the phenotype of bone-marrow-derived macrophages (BMDMs) in a cell-autonomous manner. SUCNRI signaling induced an anti-inflammatory phenotype in adipose-tissue-resident macrophages (ATMs) and dampened tissue inflammation both at steady state and after challenges that

disrupted metabolic homeostasis. Our data strengthen the idea that macrophages have a key role in the pathogenesis of obesity and identify succinate–SUCNRI signaling as a metabolic guardian in inflammatory-associated disorders.

Results

Myeloid *Sucnr1* deficiency provokes inflammation and glucose intolerance. To elucidate the role of succinate–SUCNRI signaling in macrophages, we crossed mice bearing a conditional loxP-flanked ('floxed') allele of *Sucnr1* (*Sucnr1^{fl/fl}*, used as control mice) to transgenic mice expressing bacterial Cre recombinase under the

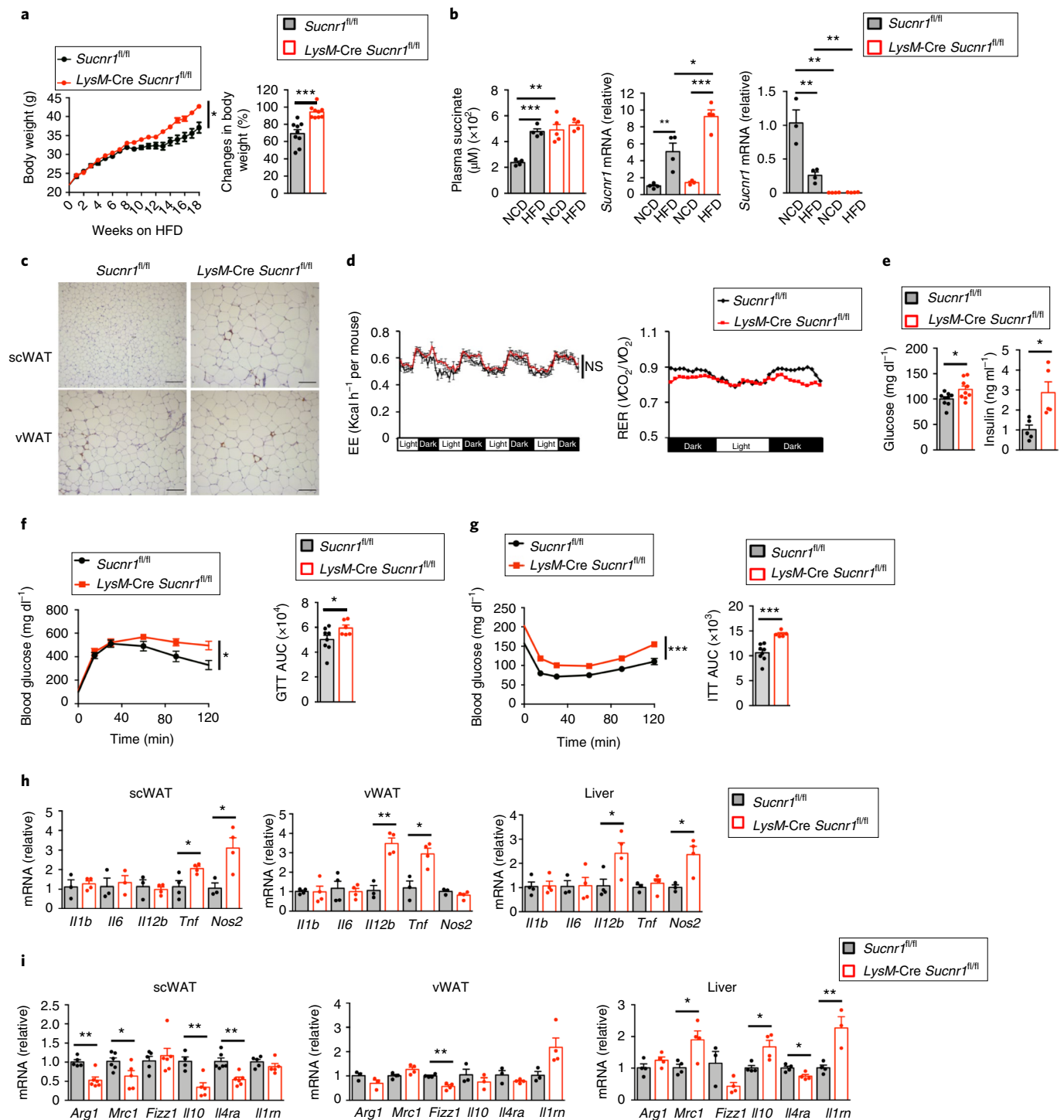


Fig. 2 | *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* mice on HFD are prone to develop obesity, glucose intolerance and insulin sensitivity. **a**, Body-weight progression in *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* mice and age-matched *Sucnr1^{fl/fl}* littermates fed a HFD for 18 weeks ($n=9$ mice). **b**, Left, fasting plasma succinate in *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* and *Sucnr1^{fl/fl}* mice fed a HFD or NCD ($n=4$ for *Sucnr1^{fl/fl}* and $n=5$ for *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* on NCD; $n=4$ mice on HFD). Right, qPCR analysis of *Sucnr1* mRNA in scWAT ($n=4$ for *Sucnr1^{fl/fl}* and $n=3$ for *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* on NCD; $n=4$ mice on HFD) and scWAT ATMs as in **a** (right) ($n=4$ biologically independent samples). **c**, Immunohistochemical staining of F4/80+ cells in scWAT and vWAT as in **a**. Representative images from two independent experiments ($n=4$ mice). Scale bars, 1 mm. **d**, Energy expenditure (EE) (left) and respiratory exchange ratio (RER) (right) during light and dark hours, as in **a** ($n=5$ mice). **e**, Fasting serum glucose ($n=9$ mice) and insulin levels ($n=5$ mice) as in **a**. **f, g**, GTT (**f**; $n=8$ *Sucnr1^{fl/fl}*; $n=6$ *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}*) and ITT (**g**; $n=8$ *Sucnr1^{fl/fl}*; $n=5$ *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}*) and their respective area under the curve as in **a**. **h, i**, qPCR analysis of pro-inflammatory (**h**; $n=4$ mice) and anti-inflammatory (**i**; $n=6$ mice) genes in scWAT, vWAT and liver as in **a** from two independent experiments. Results are expressed as mean \pm s.e.m.; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; NS, non-significant (two-tailed unpaired *t*-test in bar graphs and two-way analysis of variance in body-weight, GTT and ITT curves).

control of the lysozyme 2 promoter (*LysM-Cre*) to generate mice with myeloid-cell-specific *Sucnr1* deficiency (hereafter referred to as *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}*) (Supplementary Fig. 1). *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}*

mice were born in a Mendelian ratio, and no obvious morphological differences were observed between genotypes (data not shown). Gene analysis showed that expression of *Sucnr1* mRNA was

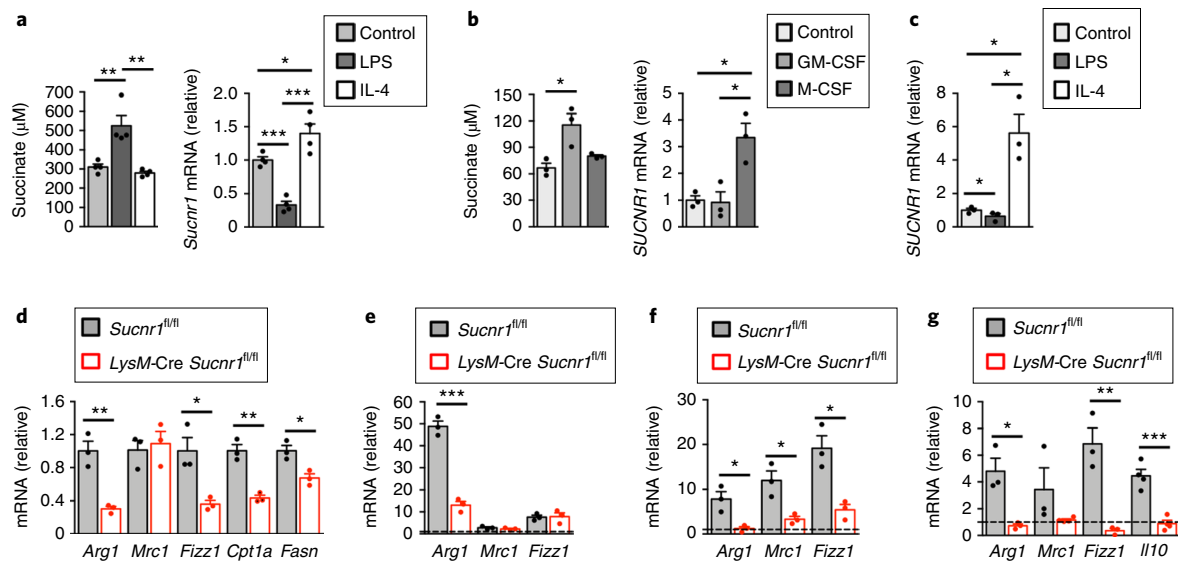


Fig. 3 | Signaling by succinate via SUCNR1 promotes an anti-inflammatory macrophage program in a cell-autonomous manner. **a**, Succinate secretion in 24 h-conditioned medium (left) and *Sucnr1* mRNA expression (right) of peritoneal macrophages from *Sucnr1^{fl/fl}* mice, without stimulation or stimulated with LPS or IL-4 for 6 h ($n = 4$). **b**, Succinate secretion in 24 h-conditioned medium CM (left) and *SUCNR1* mRNA expression (right) in hPBMCs non-differentiated (control) or differentiated with GM-CSF or M-CSF for 7 d ($n = 3$). **c**, *SUCNR1* mRNA expression of hPBMCs differentiated with M-CSF, and then unstimulated or stimulated for 24 h with LPS or IL-4 ($n = 3$). **d**, qPCR mRNA analysis of selected genes in peritoneal macrophages from *Sucnr1^{fl/fl}* and *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* mice ($n = 3$). **e**, qPCR analysis in peritoneal macrophages after IL-4 stimulation for 6 h ($n = 3$). Results are expressed relative to a basal state represented as 1. **f**, qPCR mRNA analysis in *Sucnr1^{fl/fl}* and *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* BMDMs stimulated with M-CSF for 7 d ($n = 3$), relative to their respective basal expression as 1. **g**, qPCR mRNA analysis in BMDM^{M-CSF} stimulated with succinate (200 µM) overnight ($n = 4$). **a–f**, n represents biologically independent samples. Data are shown as mean \pm s.e.m.; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (two-tailed unpaired t -test).

negligible in BMDMs, elicited-peritoneal macrophages and adipose-tissue-resident macrophages (ATMs) from *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* mice (Fig. 1a). No significant differences were found between *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* and *Sucnr1^{fl/fl}* mice in body and fat-pad weight (Fig. 1b,c and Supplementary Fig. 2a) and energy metabolic parameters measured by indirect calorimetry (Supplementary Fig. 2b,c) when they were fed a normal chow diet (NCD) for 20 weeks. Serum glucose was also comparable between genotypes (Fig. 1c); however, insulin levels were higher in *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* mice (Fig. 1c), and they also exhibited impaired glucose tolerance (Fig. 1d) and insulin sensitivity (Fig. 1e) compared with *Sucnr1^{fl/fl}* mice. Next, we evaluated the inflammatory status of white adipose tissue (WAT) and liver in *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* and *Sucnr1^{fl/fl}* mice. Gene analysis showed that the expression of genes typically linked to the development of insulin resistance, *Il1b*, *Il6*, *Il12b*, *Tnf* and *Nos2*, was higher in the subcutaneous (sc) and visceral (v) WAT and liver in *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* mice than in *Sucnr1^{fl/fl}* mice (Fig. 1f), whereas *Arg1*, *Mrc1*, *Fizz1* (also known as *Retnla*), *Il10*, *Il4ra* and *Il1rn* were downregulated, particularly in the scWAT (Fig. 1g).

We next assessed the timing of glucose intolerance and insulin sensitivity in *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* mice. Insulin resistance, but not glucose intolerance, was detected in 15-week-old *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* mice, but not in *Sucnr1^{fl/fl}* mice (Supplementary Fig. 2d). WAT and liver inflammation, as assessed by expression of pro-inflammatory genes (*Il1b*, *Il6*, *Il12b*, *Tnf* and *Nos2*), was manifest at 12 weeks of age in *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* mice (Supplementary Fig. 2e), at a time when glucose tolerance and insulin sensitivity were still similar to *Sucnr1^{fl/fl}* control mice (Supplementary Fig. 2d), suggesting that in this model inflammation precedes the induction of insulin resistance.

Mirroring the increase in adipose-tissue inflammation, the number of CD11b⁺F4/80⁺ macrophages in the stromal vascular fraction (SVF) of scWAT and vWAT (referred to as ATMs hereafter) was significantly higher in *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* than in *Sucnr1^{fl/fl}* mice, as measured by flow cytometry (Fig. 1h). The percentage

of SVF CD11b⁺ myeloid cells in the scWAT and vWAT were similar in *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* and *Sucnr1^{fl/fl}* mice (Supplementary Fig. 2f) and there were no significant differences in the number of CD11b⁺Ly6G⁺ neutrophils (Supplementary Fig. 2g). Sorting of CD11b⁺CD11c⁺CD206⁻ pro-inflammatory macrophages and CD11b⁺CD11c⁻CD206⁺ anti-inflammatory macrophages²⁶ from the scWAT indicated a significant increase in the percentage of CD11b⁺CD11c⁺CD206⁻ macrophages in *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* (25.9%) compared with *Sucnr1^{fl/fl}* mice (18.8%), concomitant with a decrease in the percentage of CD11b⁺CD11c⁻CD206⁺ macrophages (0.8%) in *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* mice compared with *Sucnr1^{fl/fl}* mice (1.3%; Supplementary Fig. 2h). In addition, immunoblot analysis of mitogen-activated protein kinase JNK phosphorylation in adipose tissue²⁷ indicated JNK activation in the scWAT and vWAT of *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* mice relative to *Sucnr1^{fl/fl}* mice (Fig. 1i). These results suggested that myeloid-specific deficiency of *Sucnr1* promoted an overt pro-inflammatory response and disrupted glucose homeostasis during steady state.

Myeloid *Sucnr1* deficiency exacerbates diet-induced obesity.

We next assessed the susceptibility of *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* mice to high-fat diet (HFD)-induced obesity. Body-weight gain was significantly increased in HFD *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* mice relative to HFD *Sucnr1^{fl/fl}* mice (Fig. 2a and Supplementary Fig. 3a), which correlated with a significant increase in the mass of the WAT, pancreas and liver (Supplementary Fig. 3b). Plasma levels of succinate were significantly higher in *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* mice than in *Sucnr1^{fl/fl}* mice (Fig. 2b). Also, intracellular succinate was higher in WAT (Supplementary Fig. 3c), adipocytes and ATMs isolated from fat depots (Supplementary Fig. 3d) of *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* than of *Sucnr1^{fl/fl}* mice. Expression of *Sucnr1* mRNA in scWAT was higher in HFD *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* and HFD *Sucnr1^{fl/fl}* mice than in NCD mice of both genotypes (Fig. 2b), whereas HFD decreased the expression of *Sucnr1* mRNA in ATMs from scWAT of *Sucnr1^{fl/fl}* mice

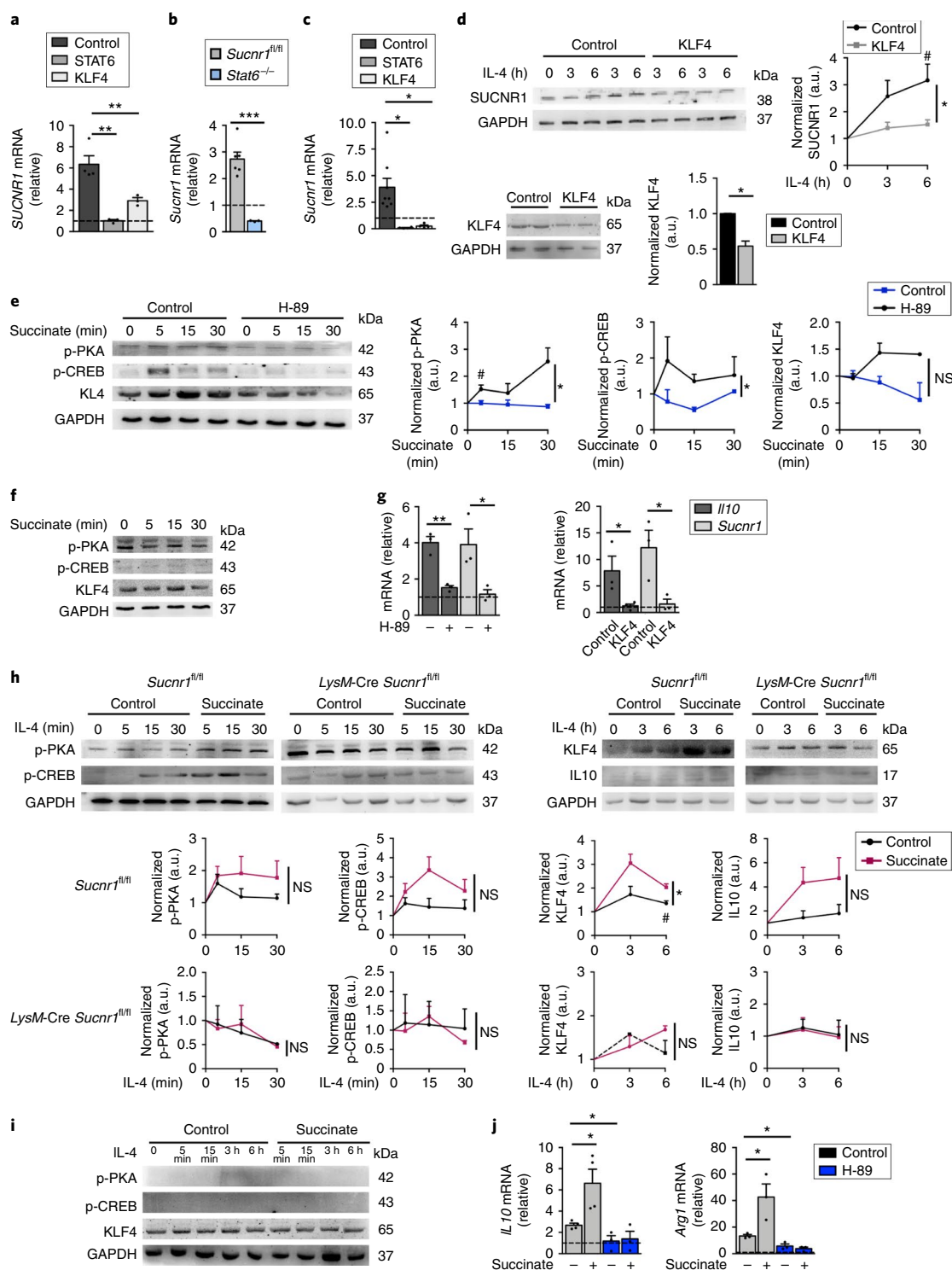


Fig. 4 | SUCNR1 signaling in macrophages. **a**, *SUCNR1* mRNA in THP1 cells transfected with siRNAs (control, STAT6 and KLF4) and stimulated with IL-4 for 6 h (control, $n=4$; STAT6 and KLF4, $n=3$). **b**, **c**, qPCR analysis of expression of *Sucnr1* in *Sucnr1^{fl/fl}* BMDMs ($n=6$) and *Stat6^{-/-}* BMDMs ($n=3$) (**b**) and *Sucnr1^{fl/fl}* BMDMs transfected with siRNAs for STAT6 ($n=4$), KLF4 ($n=4$) or control vector ($n=8$) (**c**) after stimulation with IL-4. **d-f**, Immunoblot analysis of selected proteins in *Sucnr1^{fl/fl}* BMDMs transfected with control and KLF4 siRNAs (**d**), *Sucnr1^{fl/fl}* BMDMs pretreated with H-89 for 30 min (**e**) and *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* BMDMs stimulated with succinate (**f**). **g**, qPCR analysis of selected genes in *Sucnr1^{fl/fl}* BMDMs pretreated with H-89 or transfected with siRNA KLF4 after succinate stimulation for 6 h ($n=3$ per group, except $n=4$ for *Il10* mRNA in KLF4 with succinate). **h, i**, Immunoblot analysis of *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* and *Sucnr1^{fl/fl}* BMDMs pre-incubated with succinate for 2 h (**h**) and *Sucnr1^{fl/fl}* BMDMs treated with H-89 and pre-incubated with succinate (**i**). **j**, Expression of *Il10* and *Arg1* in *Sucnr1^{fl/fl}* BMDMs pretreated with succinate and H-89 ($n=3$ and $n=4$ for *Il10* mRNA in control without H-89). Results are represented relative to respective basal expression as 1 (without IL-4 in **a-c, j**; without succinate stimulation in **g**). **d, e, f, h, i**, Representative image and densitometry analysis. **a-j**, n represents biologically independent samples. **a-c, g, j**, Values are expressed as mean \pm s.e.m.; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (two-tailed unpaired t -test). **d, e, h**, Values are expressed as mean \pm s.e.m.; # $P < 0.05$ versus time 0; * $P < 0.05$ versus control; NS, non-significant (two-tailed paired t -test). For immunoblots, GAPDH was used as the loading control. Uncropped blots are provided in source data.

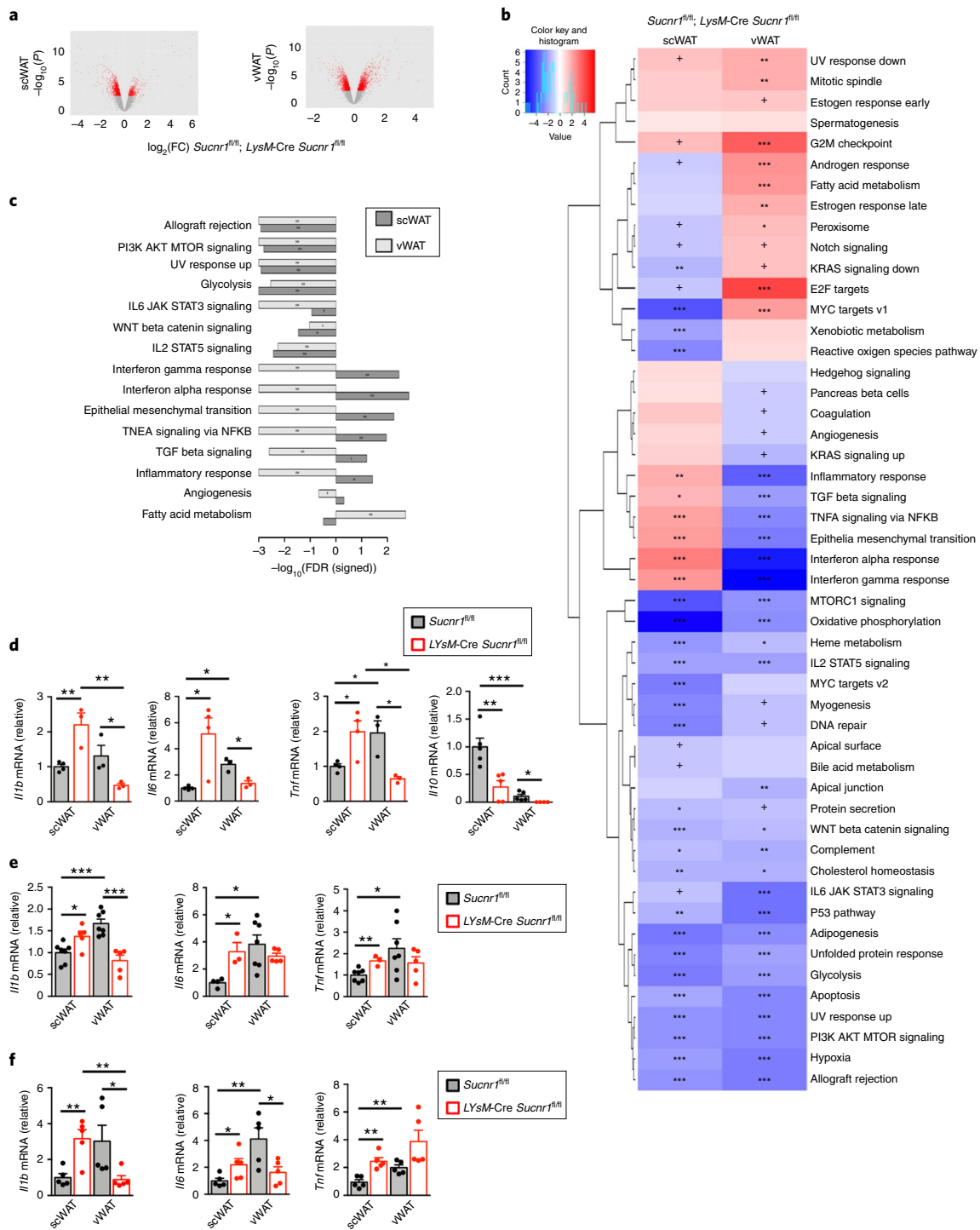


Fig. 5 | *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}*-deficient ATMs show an altered transcriptome signature. **a**, Volcano plots for microarray gene expression of scWAT and vWAT ATMs from *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* and *Sucnr1^{fl/fl}* mice. Linear models with empirical Bayes statistic (Limma) were used for differential expression. Genes in red have Benjamini-Hochberg adjusted $P < 0.05$. **b**, Heat map with GSEA normalized enrichment scores (and significance) for ATMs as in **a** on Hallmark gene sets. P values were calculated by gene set permutations. False discovery rates (FDR) are indicated by symbols in each cell: +, *, ** and *** for 0.25, 0.10, 0.05 and 0.01, respectively. **c**, Bar plots showing enrichment scores ($-\log_{10}$ of FDR P values (signed)) of Hallmarks (GSEA) distinguishing between downregulated (shown in negative) and upregulated (shown in positive) pathways (filtered by gene sets with $\text{FDR} < 0.25$) for ATMs as in **a**. **a-c**, $n = 4$ biologically independent samples. **d-f**, qPCR analysis of selected genes in ATMs (**d**) and $\text{Cd11b}^+\text{CD11c}^+\text{CD206}^-$ (**e**) and $\text{Cd11b}^+\text{CD11c}^-\text{CD206}^+$ (**f**) cell populations from ATMs as in **a** (**d**, $n = 4$ or 3; **e**, $n = 7$ or 5; and **f**, $n = 5$ for *Sucnr1^{fl/fl}* or *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}*, respectively; biologically independent samples). Data are expressed as mean \pm s.e.m.; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (two-tailed unpaired t -test).

(Fig. 2b). This suggested that the increased expression of *Sucnr1* mRNA in the scWAT in HFD *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* and *Sucnr1^{fl/fl}* mice originated from mature adipocytes.

The size of adipocytes in the scWAT of HFD *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* mice was significantly increased compared with *Sucnr1^{fl/fl}* mice (Supplementary Fig. 3e). There was also an increase in the number

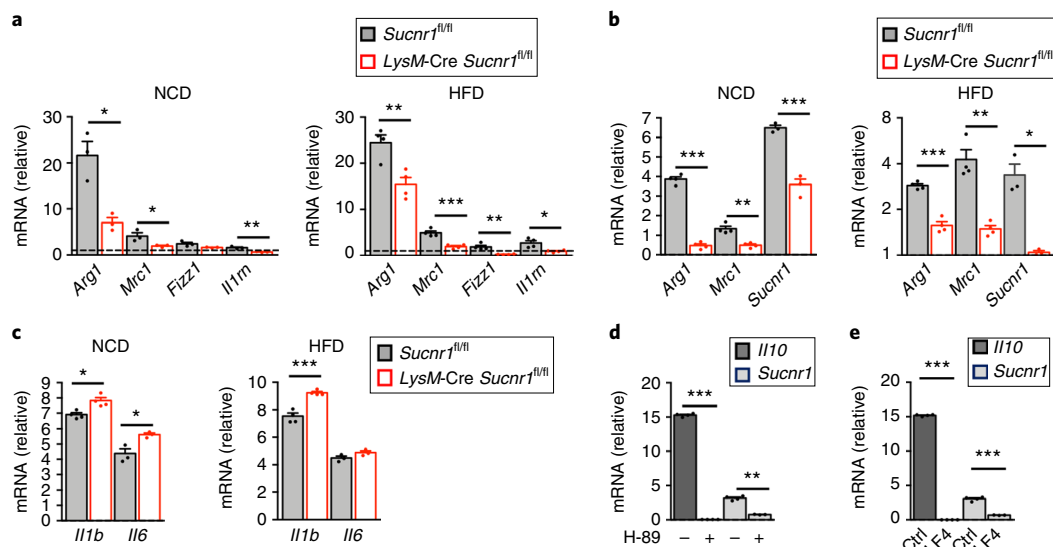


Fig. 6 | *Sucnr1*-deficient subcutaneous ATMs are unresponsive to IL-4 and succinate. **a**, qPCR analysis of selected genes in scWAT ATMs from *Sucnr1^{fl/fl}* and *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* mice fed a NCD or HFD stimulated with IL-4 for 6 h ($n=3$ for NCD and $n=4$ for HFD, except $n=3$ in *Il1rn* mRNA in *Sucnr1^{fl/fl}*). **b**, qPCR analysis of selected genes as in **a** stimulated with succinate for 6 h ($n=4$, except $n=3$ for *Sucnr1* mRNA). **c**, qPCR analysis of selected genes as in **a** stimulated with LPS for 6 h ($n=4$, except $n=3$ for *Il6* mRNA). **d**, qPCR analysis of gene expression of *Il10* and *Sucnr1* in scWAT ATMs on a NCD, pretreated or not with H-89 (30 min) before stimulation with succinate for 6 h ($n=4$, except $n=3$ for *Sucnr1* mRNA in H-89). **e**, qPCR analysis of gene expression of *Il10* and *Sucnr1* as in **d**, transfected with siRNA against KLF4 or control before stimulation with succinate for 6 h ($n=4$, except $n=3$ for *Sucnr1* mRNA in KLF4). Results are presented relative to their respective basal expression as 1 (without IL-4 in **a**, without succinate in **b**, **d** and **e**) and without LPS in **c**. **a–e**, n represents biologically independent samples. Values are expressed as mean \pm s.e.m., in **b–e** data are \log_2 (value + 1) transformed; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (two-tailed unpaired t -test).

of crown-like structures in the scWAT and vWAT of HFD *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* mice compared with control mice (Fig. 2c). Of note, the increased weight gain in HFD *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* mice was not associated with changes in food intake compared with HFD *Sucnr1^{fl/fl}* mice (Supplementary Fig. 3f). Indirect calorimetry showed similar oxygen consumption and carbon dioxide production in both genotypes (Supplementary Fig. 3g). Likewise, there were no significant differences in energy expenditure (Fig. 2d). When the data were corrected to body weight, analysis of covariance²⁸ indicated that the differences detected in energy expenditure were genotype dependent (Supplementary Fig. 3h). The lower respiratory exchange ratio (VCO_2/VO_2) in HFD *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* compared with HFD *Sucnr1^{fl/fl}* mice (Fig. 2d) indicated a preference in these mice to metabolize fat as energy²⁹.

HFD *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* mice had a higher fasting hyperglycemia and hyperinsulinemia than HFD *Sucnr1^{fl/fl}* mice (Fig. 2e). Consistently, HFD *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* mice showed impaired glucose tolerance (Fig. 2f) and insulin sensitivity (Fig. 2g) relative to HFD *Sucnr1^{fl/fl}* mice. No significant differences in glucose tolerance and insulin sensitivity were detected between both genotypes before their body weight diverged (11–15 weeks of age) (Supplementary Fig. 3i), indicating that the loss of glucose homeostasis in HFD *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* mice was linked to their obese phenotype. Further, no significant differences in oxygen consumption, carbon dioxide production and energy expenditure were detected between genotypes at 14 weeks of age (Supplementary Fig. 3j), indicating that, in response to dietary excess, the metabolic differences between both genotypes were mostly related to weight gain.

Similarly to the findings on NCD, HFD *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* mice showed higher expression of several pro-inflammatory markers (*Il12b*, *Tnf* and *Nos2*) in WAT and liver (Fig. 2h) and a decrease in the expression of some anti-inflammatory markers (*Arg1*, *Mrc1*, *Il10* and *Il4ra*) in scWAT (Fig. 2i) compared with HFD *Sucnr1^{fl/fl}* mice. We observed a higher frequency of CD11b⁺CD11c⁺CD206⁻

pro-inflammatory macrophages (23.8%), along with a trend for a lower frequency of CD11b⁺CD11c⁻CD206⁺ anti-inflammatory macrophages (1.3%) in the scWAT of HFD *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* compared with HFD *Sucnr1^{fl/fl}* mice (19.3 and 3.1%, respectively) (Supplementary Fig. 3k). Taken together, the results indicate that myeloid-specific *Sucnr1* deficiency increases the susceptibility to diet-induced obesity.

***Sucnr1* signaling regulates cell-autonomous macrophage polarization.**

To address whether intracellular and extracellular succinate had different effects on macrophages, first we investigated whether expression of *Sucnr1* mRNA was affected by the activation status of macrophages. As reported before^{3,23,24}, stimulation with LPS, but not interleukin-4 (IL-4), increased the secretion of succinate in peritoneal macrophages in vitro (Fig. 3a), and correlated with an accumulation of intracellular succinate (Supplementary Fig. 4a), as previously described³⁰. Expression of *Sucnr1* mRNA in peritoneal macrophages was robustly increased by IL-4 and strongly decreased by LPS (Fig. 3a), while *SUCNR1* mRNA in the human monocytic-like cell line THP1 was induced by macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) and decreased by granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) (Supplementary Fig. 4b). In macrophages differentiated with GM-CSF from human peripheral blood mononuclear cells (hPBMCs), succinate secretion was increased compared with non-differentiated (control) cells, whereas *SUCNR1* mRNA was increased in macrophages differentiated with M-CSF compared with control cells (Fig. 3b). Polarization of hPBMC macrophages by GM-CSF or M-CSF was confirmed by measuring the expression of pro-inflammatory-associated (*Il1b*, *Il6*, *Il12b*, *Tnf* and *MCP1*) and anti-inflammatory-associated (*PPAR γ* and *MRC1*) genes, respectively³¹ (Supplementary Fig. 4c). Macrophages derived from hPBMCs and differentiated with M-CSF (hereafter hPBMC^{M-CSF} macrophages) can be polarized towards a pro- or an anti-inflammatory phenotype with the appropriate exogenous stimuli³². LPS

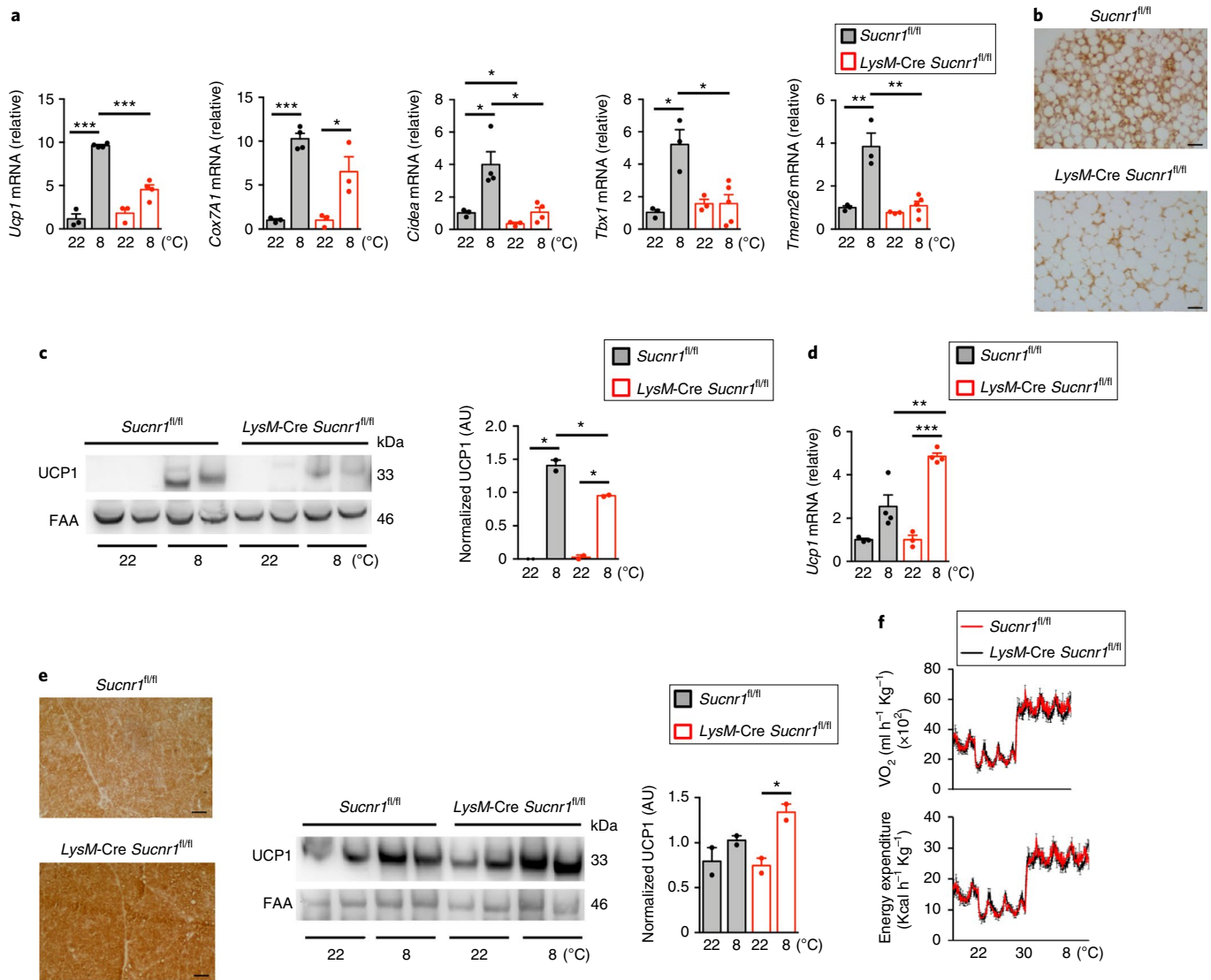


Fig. 7 | *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* mice are refractory to prolonged cold-induced browning in scWAT. **a**, qPCR analysis of *Ucp1* and typical markers of beige activation in scWAT from male *Sucnr1^{fl/fl}* and *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* mice housed at 8 °C or 22 °C for 6 d ($n=3$ mice at 22 °C; $n=4$ for *Sucnr1^{fl/fl}* and $n=5$ for *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* at 8 °C). Results are transformed as $\log_2(\text{value} + 1)$ normalized to gene expression of *Sucnr1^{fl/fl}* mice at 22 °C. **b**, Representative images of immunohistochemical staining of UCP1 in scWAT as in **a** housed at 8 °C, from two independent experiments ($n=4$ mice). Scale bars, 200 μm . **c**, Representative images of immunoblot analysis of UCP1 in scWAT (left) as in **a** and quantification performed as the ratio of UCP1/FAA presented in arbitrary units (right) ($n=2$ mice). **d**, qPCR analysis of *Ucp1* in BAT as in **a** ($n=3$ per genotype at 22 °C and $n=4$ per genotype at 8 °C). **e**, Representative images of immunohistochemical staining of UCP1 in BAT from two independent experiments (left, $n=4$ mice) and immunoblot analysis of UCP1 protein in BAT (middle) and quantification (right) performed as the ratio of UCP1/FAA presented in arbitrary units ($n=2$ mice). Scale bars, 200 μm . Representative results from two independent experiments with similar results. Uncropped blots are provided in source data. **f**, Energy expenditure and oxygen consumption (VO_2) of *Sucnr1^{fl/fl}* and *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* mice acutely subjected to 8 °C from thermoneutrality (30 °C). Data are shown as mean \pm s.e.m.; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (two-tailed unpaired *t*-test).

significantly decreased the expression of *SUCNRI* mRNA in macrophages derived from hPBMCs and differentiated with M-CSF, whereas IL-4 strongly enhanced its expression (Fig. 3c). Accordingly, the expression of anti-inflammatory markers, such as *Arg1* and *Fizz1*, and fatty acid metabolic genes, such as *Cpt1a* and *Fasn*, was significantly lower in peritoneal macrophages isolated from *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* compared with those isolated from *Sucnr1^{fl/fl}* mice (Fig. 3d). We detected a lower expression of *Arg1* and *Mrc1* in IL-4-treated *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* peritoneal macrophages compared with IL-4-treated *Sucnr1^{fl/fl}* peritoneal macrophages (Fig. 3e). M-CSF-treated BMDMs (hereafter BMDMs^{M-CSF}) from *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* mice also expressed less anti-inflammatory genes (*Arg1*, *Mrc1* and *Fizz1*) compared with *Sucnr1^{fl/fl}* BMDMs^{M-CSF} (Fig. 3f). M-CSF, but

not GM-CSF, induced the expression of *Sucnr1* mRNA in BMDMs (Supplementary Fig. 4d). Accordingly, succinate enhanced the expression *Arg1*, *Mrc1*, *Fizz1* and *Il10* in *Sucnr1^{fl/fl}* BMDMs^{M-CSF}, but not in *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* BMDMs^{M-CSF} (Fig. 3g). Addition of succinate to *Sucnr1^{fl/fl}* BMDMs^{M-CSF} did not increase the amount of intracellular succinate, whereas the cell-permeable dimethyl succinate did (Supplementary Fig. 4e). There were no significant differences in the amount of intracellular succinate between *Sucnr1^{fl/fl}* BMDMs and *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* BMDMs (Supplementary Fig. 4f).

An in silico analysis of the *Sucnr1* promoter region in BMDMs revealed binding sites for the IL-4-responsive transcription factor STAT6 (Supplementary Fig. 5a). To test whether expression of *SUCNRI* in macrophages was regulated by IL-4, we used short

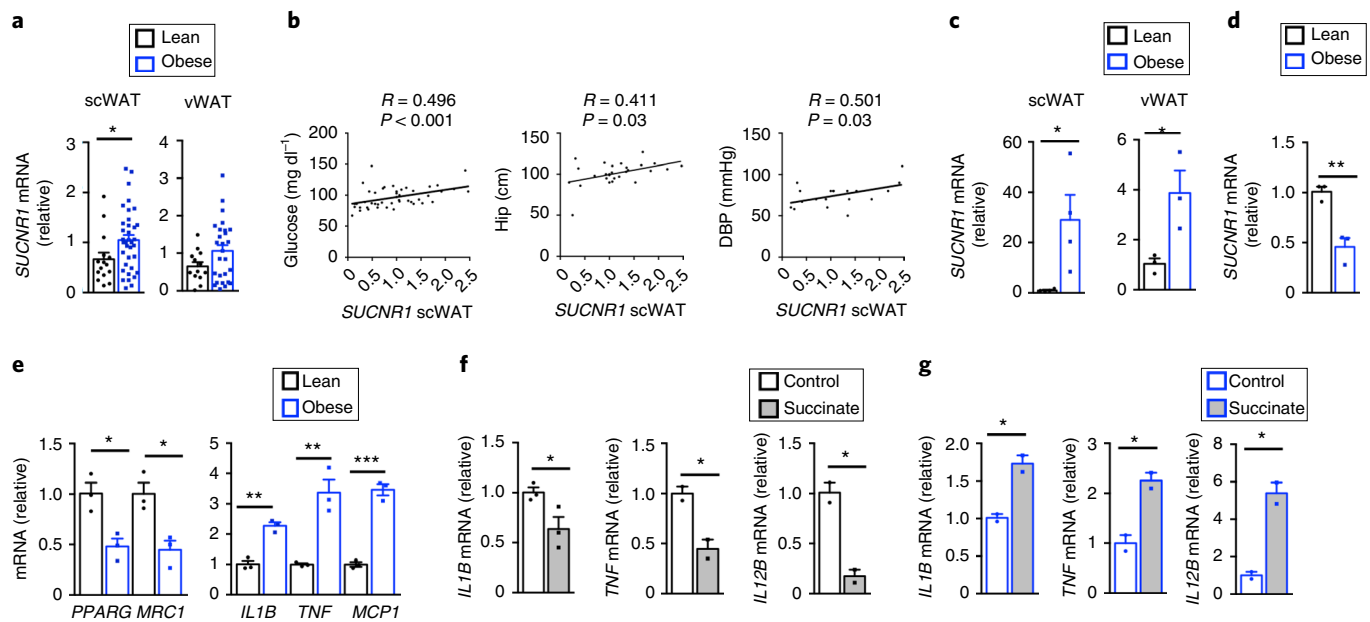


Fig. 8 | Obese human adipose tissue is insensitive to the anti-inflammatory effects of succinate. **a**, qPCR analysis of expression of *SUCNR1* in scWAT and vWAT from human lean ($n=15$ for scWAT and $n=13$ for vWAT) and obese ($n=36$ for scWAT and $n=27$ for vWAT) patients. **b**, Correlation between *SUCNR1* gene expression in scWAT with glucose ($n=46$), hip circumference ($n=28$) and diastolic blood pressure (DBP) ($n=19$) from human patients. **c,d**, qPCR analysis of expression of *SUCNR1* in subcutaneous adipocytes (scAD) or visceral adipocytes (vAD) (**c**) and scWAT ATMs (**d**) from lean and obese patients ($n=4$, $n=3$ and $n=3$). **e**, qPCR analysis of selected genes in human scWAT ATMs ($n=3$). **f,g**, qPCR analysis of pro-inflammatory genes in human scWAT explants, unstimulated or stimulated with succinate for 24 h, from lean (**f**) and obese (**g**) patients ($n=2$ and $n=3$ for expression of *IL1B*, *TNF* and *IL12B* in scWAT derived from a pool of three patients per phenotype). **a-g**, n represents biologically independent samples. Results are expressed as mean \pm s.e.m.; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (two-tailed unpaired t -test). For **b** Spearman's (in glucose and HIP graph) or Pearson's (in diastolic blood pressure graph) correlation analysis was used.

interfering RNA (siRNA) to knock down the expression of STAT6 or KLF4, a transcription factor whose expression is induced by STAT6 in macrophages³³. The IL-4-induced expression of *IL10*, *PPARG* and *IL1RN* (Supplementary Fig. 5b) and *SUCNR1* (Fig. 4a) was lower in THP1 cells in which STAT6 or KLF4 were knocked down compared with control-siRNA-treated THP1 macrophages (65% or 68% efficiency of knockdown, respectively). IL-4 stimulation upregulated *Sucnr1* (Fig. 4b) and *Arg1*, *Mrc1* and *Il10* mRNA (Supplementary Fig. 5c) in *Sucnr1*^{fl/fl} BMDMs^{M-CSF}, but not in *Stat6*^{-/-} BMDMs^{M-CSF}. Knockdown of STAT6 and KLF4 also decreased the upregulation of *Sucnr1* (Fig. 4c) and *Arg1*, *Mrc1* and *Il10* mRNA (Supplementary Fig. 5d) in response to IL-4 in *Sucnr1*^{fl/fl} BMDMs^{M-CSF}. Knockdown of KLF4 in BMDMs^{M-CSF} also decreased the IL-4-induced expression of *SUCNR1* protein (Fig. 4d), while IL-4 did not upregulate expression of KLF4 or *SUCNR1* protein in *Stat6*^{-/-} BMDMs^{M-CSF} (Supplementary Fig. 5e).

The KLF4 promoter contains cyclic AMP response element-binding protein (CREB)-binding sites³⁴ and can therefore be modulated by G protein-coupled receptor ligands, which can act synergically with IL-4 through the activation of the cyclic AMP-CREB pathway^{34,35}. Consistent with this notion, short-term exposure of *Sucnr1*^{fl/fl} BMDMs^{M-CSF} to succinate induced the phosphorylation of protein kinase A (PKA) and CREB, which was blocked by the PKA inhibitor H-89 (Fig. 4e). The succinate-mediated activation of the PKA-CREB pathway was not detected in *LysM-Cre Sucnr1*^{fl/fl} BMDMs^{M-CSF} (Fig. 4f), while H-89-mediated inhibition of PKA or knockdown of *Klf4* by siRNA in *Sucnr1*^{fl/fl} BMDMs^{M-CSF} suppressed the induction of *Il10* and *Sucnr1* mRNA by succinate (Fig. 4g). Finally, we assessed the effect of succinate on IL-4 signaling. Whereas succinate treatment did not significantly modify the IL-4-induced activation of STAT6 in *Sucnr1*^{fl/fl} BMDMs^{M-CSF} (Supplementary Fig. 5f), succinate increased the IL-4-induced

activation of PKA and CREB in these cells, an effect that was absent in *LysM-Cre Sucnr1*^{fl/fl} BMDMs^{M-CSF} (Fig. 4h) and abolished by H-89 treatment (Fig. 4i). Succinate increased the IL-4-induced expression of KLF4 and IL-10 in *Sucnr1*^{fl/fl} BMDMs^{M-CSF}, but not in *LysM-Cre Sucnr1*^{fl/fl} BMDMs^{M-CSF} (Fig. 4h), suggesting that succinate enhanced IL-4 signaling by modulating the activation of PKA and CREB and the expression of KLF4. Accordingly, addition of H-89 prevented the succinate-induced increase in *Il10* and *Arg1* mRNA in IL-4-treated BMDMs^{M-CSF} (Fig. 4j). Overall, these data indicated that succinate-SUCNR1 signaling promoted an anti-inflammatory phenotype in macrophages.

***Sucnr1* deficiency alters intracellular signaling in ATMs.** Because ATMs play key roles in obesity-induced inflammation³⁶, we performed transcriptomic analysis on ATMs sorted from the scWAT and vWAT of *LysM-Cre Sucnr1*^{fl/fl} and *Sucnr1*^{fl/fl} mice. Genes (242 total, 85 upregulated, 157 downregulated) were differentially expressed in scWAT ATMs, and 271 genes (174 upregulated, 97 downregulated) were differentially expressed in vWAT ATMs (fold change > 2 , adjusted $P < 0.05$) from *LysM-Cre Sucnr1*^{fl/fl} mice compared with *Sucnr1*^{fl/fl} mice (Fig. 5a). Gene set enrichment analysis (GSEA) indicated that loss of *Sucnr1* resulted in altered gene expression patterns in vWAT ATMs compared with scWAT ATMs (Fig. 5b). Specifically, inflammatory pathways such as interferon, epithelial mesenchymal transition and tumor necrosis factor (TNF) response were upregulated in *LysM-Cre Sucnr1*^{fl/fl} compared with *Sucnr1*^{fl/fl} scWAT ATMs, while they were downregulated in *LysM-Cre Sucnr1*^{fl/fl} compared with *Sucnr1*^{fl/fl} vWAT ATMs (Fig. 5c). The opposite outcomes of *Sucnr1* deficiency in the transcriptional signature of ATMs (Fig. 5c and Supplementary Fig. 6a,b) were associated to the pro-inflammatory profile of *Sucnr1*^{fl/fl} vWAT ATMs compared with *Sucnr1*^{fl/fl} scWAT ATMs (Supplementary Fig. 6a,b), previously

described in vWAT compared with scWAT³⁷. GSEA analysis of the genes differentially regulated between scWAT ATMs and vWAT ATMs indicated the upregulation of inflammatory pathways in *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* vWAT ATMs compared with *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* scWAT ATMs (Supplementary Fig. 7a,b and Supplementary Tables 1 and 2). Independent validation by quantitative PCR (qPCR) indicated increased expression of *Il1b*, *Il6* and *Tnf* and decreased expression of *Il10* in *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* scWAT ATMs compared with *Sucnr1^{fl/fl}* scWAT ATMs (Fig. 5d). A decrease in *Tnf* and *Il10* mRNA was observed in *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* vWAT ATMs compared with *Sucnr1^{fl/fl}* vWAT ATMs (Fig. 5d). Both CD11b⁺CD11c⁺CD206⁻ pro-inflammatory and CD11b⁺CD11c⁻CD206⁺ anti-inflammatory macrophages from the *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* scWAT (but not the vWAT) showed increased expression of pro-inflammatory genes compared with CD11b⁺CD11c⁺CD206⁻ and CD11b⁺CD11c⁻CD206⁺ macrophages from *Sucnr1^{fl/fl}* mice (Fig. 5e,f).

The IL-4- and succinate-induced expression of anti-inflammatory markers (*Arg1*, *Mrc1*, *Fizz1* and *Il1rn*) was lower in *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* than in *Sucnr1^{fl/fl}* scWAT ATMs, both in cells isolated from mice fed a NCD or HFD (Fig. 6a,b). By contrast, LPS induction of *Il1b* mRNA was higher in *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* than in *Sucnr1^{fl/fl}* scWAT ATMs, in cells isolated from mice fed a NCD or HFD (Fig. 6c). Moreover, the succinate-induced expression of *Il10* and *Sucnr1* was blocked by inhibition of PKA (Fig. 6d) or knockdown of KLF4 (Fig. 6e) in scWAT ATMs from *Sucnr1^{fl/fl}* mice. Thus, signaling through SUCNR1 had both inflammatory²³ and anti-inflammatory program in scATMs.

Myeloid *Sucnr1* deficiency impairs cold-induced browning of scWAT. Type 2 immune signaling regulates adipose thermogenesis^{38–40}. Next, we investigated whether succinate–SUCNR1 signaling in macrophages was involved in beige cell activation in the scWAT and cold-induced thermogenesis. Prolonged cold exposure (8 °C for 6 d) led to a marked induction of *Ucp1* and other key thermogenic genes in the scWAT of *Sucnr1^{fl/fl}* mice, but only to poor induction in the scWAT of *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* mice (Fig. 7a). Immunohistochemical analysis of scWAT indicated the formation of multilocular, brown-like adipocytes in *Sucnr1^{fl/fl}* mice following cold exposure, but this effect was noticeably reduced in *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* mice (Fig. 7b). Immunoblotting indicated a marked impairment in the cold-induced expression of *Ucp1* protein in the scWAT of *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* compared with *Sucnr1^{fl/fl}* mice (Fig. 7c). However, the interscapular brown adipose tissue (BAT) of *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* mice had higher *Ucp1* expression, both mRNA (Fig. 7d) and protein (Fig. 7e), following prolonged cold exposure compared with the interscapular BAT of *Sucnr1^{fl/fl}* mice. No significant differences were detected in energy expenditure or whole-body oxygen consumption in *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* and *Sucnr1^{fl/fl}* mice housed at ambient temperature (22 °C), thermoneutrality (30 °C) or prolonged cold exposure (Fig. 7f). These results indicate that loss of *Sucnr1* in myeloid cells limited the browning of scWAT, which is considered a type 2 immune response⁴⁰.

Obesity disturbs succinate–SUCNR1 signaling in human adipose tissue. Circulating levels of succinate are higher in obese than in lean humans¹¹. To determine whether obesity impacts SUCNR1 function in human adipose tissues, we analyzed its expression in scWAT and vWAT biopsies from people classified according to body mass index (BMI) (Supplementary Table 3). Circulating levels of succinate were higher in obese subjects than in lean controls (Supplementary Table 3)¹¹. Further, expression of *SUCNR1* mRNA was higher in WAT from obese subjects than from lean ones, particularly in scWAT (Fig. 8a). Notably, we found a positive association between expression of *SUCNR1* in scWAT and clinical parameters associated with an altered metabolic profile such as blood glucose, hip

circumference and diastolic blood pressure (Fig. 8b). Cellular fractionation of scWAT biopsies indicated increased expression of *SUCNR1* in mature adipocytes in obese subjects compared with lean (Fig. 8c), whereas the opposite was seen in scWAT ATMs (Fig. 8d). The decrease in *SUCNR1* mRNA in scWAT ATMs from obese compared with lean subjects correlated with lower *PPARG* and *MRC1* mRNA expression and was concomitant with higher expression of the pro-inflammatory genes *IL1B*, *TNF* and *MCPI* (Fig. 8e). To examine the effects of extracellular succinate in the adipose tissue with respect to inflammation, we incubated WAT explants obtained from lean and obese subjects with succinate for 24 h. Incubation of lean-derived scWAT with succinate significantly decreased the expression of the pro-inflammatory cytokines *IL1B*, *TNF* and *IL12B* compared with non-stimulated scWAT (Fig. 8f). By contrast, succinate increased mRNA expression of *IL1B*, *TNF* and *IL12B* in vWAT compared with non-stimulated vWAT (Fig. 8g). These observations suggest that succinate–SUCNR1 signaling had an anti-inflammatory role in the human scWAT, which was disturbed in obesity.

Discussion

Here we show that loss of succinate-mediated signaling through SUCNR1 in myeloid cells impaired the induction of an anti-inflammatory program in macrophages and the response to type 2 cytokines, including those associated with diet-induced obesity^{41,42} and long-term cold exposure^{38,40}. We showed that extracellular succinate acted in cooperation with IL-4 signaling through the activation of the PKA–CREB–KLF4 pathway and increased the IL-4 response in a cell-autonomous manner. Notably, *Sucnr1* deficiency altered the phenotype of ATMs in a manner dependent on the WAT localization, by promoting an inflammatory molecular signature in scWAT ATMs. Our results suggest a mechanism by which SUCNR1 signaling contributes to resolution of acute inflammation.

In response to metabolic and inflammatory challenge, succinate accumulates in pro-inflammatory macrophages^{20,43}, which triggers an inflammatory phenotype through activation of HIF-1 α ³. In this scenario, succinate is exported to the extracellular milieu²³ where it signals through SUCNR1^{2,23}. Though intracellular succinate is considered a pro-inflammatory stimulus^{2,3,23}, our observations indicated that SUCNR1 was mostly expressed in pro-resolving or anti-inflammatory macrophages, as previously reported⁴⁴. *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* mice developed local tissue inflammation and deregulated glucose homeostasis at steady state. Moreover, these mice showed higher susceptibility to development of diet-induced obesity compared with *Sucnr1^{fl/fl}* mice. *Sucnr1^{-/-}* mice have yielded contradictory results in terms of glucose homeostasis and susceptibility to develop obesity depending on HFD composition (45% versus 60% calories from fat)^{10,18}. Our results showed enhanced weight gain and impaired glucose tolerance in *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* compared with control mice in response to 45% HFD. This contrasts with the phenotype observed in the global *Sucnr1^{-/-}* mice fed with the same diet, in which there was a decrease of macrophage infiltration into adipose tissue and an improvement of glucose tolerance compared with control mice, despite similar increase in body weight¹⁰. These differences highlight the importance of cell-specific studies assessed by conditional knockout mouse models to adequately evaluate the role of SUCNR1 in individual cell subsets.

Our data indicated that extracellular succinate promoted an anti-inflammatory program in macrophages. BMDMs, peritoneal macrophages and scWAT ATMs from the *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* mice showed increased expression of pro-inflammatory markers (for example *Il1b*, *Il12b*, *Tnf* and *Nos2*) and did not upregulate expression of anti-inflammatory markers (for example *Arg1*, *Mrc1*, *Fizz1* and *Il10*) in response to IL-4, as observed in *Sucnr1^{fl/fl}* macrophages. This suggested that extracellular succinate triggered a pro-resolving phenotype in tissue-resident macrophages as ATMs, to counterbalance the inflammatory signals and recover metabolic homeostasis.

Consistent with this notion, succinate has been proposed to act as an 'alarmin' for the innate immune system, more specifically in dendritic cells^{3,22,23}. Anti-inflammatory properties for signaling through SUCNR1 have been previously reported. For example, inflammatory macrophage-derived succinate signals through SUCNR1 in neural stem cells to induce production of prostaglandin E2, triggering the resolution of inflammation during chronic neuroinflammation in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis²⁴. Also, SUCNR1 signaling was reported as a potent activator of type 2 immunity and a surveillance mechanism for detection of certain helminths as *Trichostrongylus* in the small intestine of C57BL/6 mice²⁵. We propose a mechanism by which, like other signaling molecules such as IL-6^{45,46}, succinate is generated as part of an inflammatory program and acts as a negative feedback signal through SUCNR1 to promote an anti-inflammatory response in macrophages.

scWAT ATMs have a key role in metabolic homeostasis, and their remodeling is crucial to adequately respond to chronic positive energy balance^{47,48}. Our results indicated that in obese mice, loss of SUCNR1 in myeloid cells induced an inflammatory state in scWAT ATMs, but decreased the activation of inflammatory signaling pathways such as interferon and TNF response in vWAT ATMs. Comparative transcriptome profiling of ATMs from scWAT and vWAT from control mice revealed that vWAT ATMs were constitutively more inflamed than scWAT ATMs. This is consistent with the pro-inflammatory profile previously described in the visceral compared with the subcutaneous fat depots³⁷. Activation of SUCNR1 was reported to have a positive effect on the release of the pro-inflammatory cytokine IL-1 β in inflammatory macrophages. As such, during inflammation, succinate-SUCNR1 signaling may act as an anti-inflammatory mediator or boost inflammation²³ depending on the inflammatory status of cells expressing SUCNR1. Our data showed that activation of SUCNR1 decreased the expression of inflammatory-related genes in the scWAT of healthy subjects, whereas scWAT from obese patients was insensitive to signaling through SUCNR1. Extracellular succinate increased the expression of inflammatory markers in the scWAT from obese patients, which is known to shift towards a pro-inflammatory phenotype⁴⁹. Although obesity is characterized by high circulating amounts of succinate¹¹, ATMs from obese subjects had decreased expression of SUCNR1, along with other anti-inflammatory markers, such as PPAR γ and MRC1. This 'succinate-resistant state' in human obesity that might underlie, at least partially, the obesity-associated inflammation. The loss of this anti-inflammatory mechanism in obesity may contribute to the intrinsic inability of obese adipose tissue to resolve uncontrolled inflammation and to restore tissue homeostasis and functionality^{49,50}. As succinate-SUCNR1 signaling is emerging as a versatile and context-specific regulator of physiology and disease, further research is needed to provide a complete picture on its local and systemic modes of action.

Online content

Any methods, additional references, Nature Research reporting summaries, source data, statements of data availability and associated accession codes are available at <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0372-7>.

Received: 2 March 2018; Accepted: 5 March 2019;

Published online: 08 April 2019

References

1. Chouchani, E. T. et al. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature* **515**, 431–435 (2014).
2. Rubic, T. et al. Triggering the succinate receptor GPR91 on dendritic cells enhances immunity. *Nat. Immunol.* **9**, 1261–1269 (2008).
3. Tannahill, G. M. et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . *Nature* **496**, 238–242 (2013).

4. Toma, I. et al. Succinate receptor GPR91 provides a direct link between high glucose levels and renin release in murine and rabbit kidney. *J. Clin. Invest.* **118**, 2526–2534 (2008).
5. Murphy, M. P. & O'Neill, L. A. J. Krebs cycle reimaged: the emerging roles of succinate and itaconate as signal transducers. *Cell* **174**, 780–784 (2018).
6. Peti-Peterdi, J., Gevorgyan, H., Lam, L. & Riquier-Brison, A. Metabolic control of renin secretion. *Pflugers Arch.* **465**, 53–58 (2013).
7. Hochachka, P. W. & Dressendorfer, R. H. Succinate accumulation in man during exercise. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* **35**, 235–242 (1976).
8. Sadagopan, N. et al. Circulating succinate is elevated in rodent models of hypertension and metabolic disease. *Am. J. Hypertens.* **20**, 1209–1215 (2007).
9. Aguiar, C. J. et al. Succinate causes pathological cardiomyocyte hypertrophy through GPR91 activation. *Cell Commun. Signal.* **12**, 78 (2014).
10. van Diepen, J. A. et al. SUCNR1-mediated chemotaxis of macrophages aggravates obesity-induced inflammation and diabetes. *Diabetologia* **60**, 1304–1313 (2017).
11. Serena, C. et al. Elevated circulating levels of succinate in human obesity are linked to specific gut microbiota. *ISME J.* **12**, 1642–1657 (2018).
12. He, W. et al. Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors. *Nature* **429**, 188–193 (2004).
13. Gilissen, J., Jouret, F., Piroette, B. & Hanson, J. Insight into SUCNR1 (GPR91) structure and function. *Pharmacol. Ther.* **159**, 56–65 (2016).
14. de Castro Fonseca, M., Aguiar, C. J., da Rocha Franco, J. A., Gingold, R. N. & Leite, M. F. GPR91: expanding the frontiers of Krebs cycle intermediates. *Cell Commun. Signal.* **14**, 3 (2016).
15. Sapielha, P. et al. The succinate receptor GPR91 in neurons has a major role in retinal angiogenesis. *Nat. Med.* **14**, 1067–1076 (2008).
16. Vargas, S. L., Toma, I., Kang, J. J., Meer, E. J. & Peti-Peterdi, J. Activation of the succinate receptor GPR91 in macula densa cells causes renin release. *J. Am. Soc. Nephrol.* **20**, 1002–1011 (2009).
17. Li, Y. H., Woo, S. H., Choi, D. H. & Cho, E. H. Succinate causes alpha-SMA production through GPR91 activation in hepatic stellate cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **463**, 853–858 (2015).
18. McCreath, K. J. et al. Targeted disruption of the SUCNR1 metabolic receptor leads to dichotomous effects on obesity. *Diabetes* **64**, 1154–1167 (2015).
19. Hakak, Y. et al. The role of the GPR91 ligand succinate in hematopoiesis. *J. Leukoc. Biol.* **85**, 837–843 (2009).
20. Ryan, D. G. & O'Neill, L. A. J. Krebs cycle rewired for macrophage and dendritic cell effector functions. *FEBS Lett.* **591**, 2992–3006 (2017).
21. Saraiva, A. L. et al. Succinate receptor deficiency attenuates arthritis by reducing dendritic cell traffic and expansion of Th17 cells in the lymph nodes. *FASEB J.* **12**, f201800285 (2018).
22. Rubic-Schneider, T. et al. GPR91 deficiency exacerbates allergic contact dermatitis while reducing arthritic disease in mice. *Allergy* **72**, 444–452 (2017).
23. Littlewood-Evans, A. et al. GPR91 senses extracellular succinate released from inflammatory macrophages and exacerbates rheumatoid arthritis. *J. Exp. Med.* **213**, 1655–1662 (2016).
24. Peruzzotti-Jametti, L. et al. Macrophage-derived extracellular succinate licenses neural stem cells to suppress chronic neuroinflammation. *Cell Stem Cell* **22**, 355–368.e13 (2018).
25. Lei, W. et al. Activation of intestinal tuft cell-expressed *Sucnr1* triggers type 2 immunity in the mouse small intestine. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **115**, 5552–5557 (2018).
26. Shan, B. et al. The metabolic ER stress sensor IRE1 α suppresses alternative activation of macrophages and impairs energy expenditure in obesity. *Nat. Immunol.* **18**, 519–529 (2017).
27. Manieri, E. & Sabio, G. Stress kinases in the modulation of metabolism and energy balance. *J. Mol. Endocrinol.* **55**, R11–R22 (2015).
28. Arch, J. R., Hislop, D., Wang, S. J. & Speakman, J. R. Some mathematical and technical issues in the measurement and interpretation of open-circuit indirect calorimetry in small animals. *Int. J. Obes.* **30**, 1322–1331 (2006).
29. Virtue, S. & Vidal-Puig, A. Assessment of brown adipose tissue function. *Front. Physiol.* **4**, 128 (2013).
30. Mills, E. L. et al. Succinate dehydrogenase supports metabolic repurposing of mitochondria to drive inflammatory macrophages. *Cell* **167**, 457–470.e413 (2016).
31. Hamilton, T. A., Zhao, C., Pavicic, P. G. Jr. & Datta, S. Myeloid colony-stimulating factors as regulators of macrophage polarization. *Front. Immunol.* **5**, 554 (2014).
32. Jaguin, M., Houlbert, N., Fardel, O. & Lecureur, V. Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. *Cell Immunol.* **281**, 51–61 (2013).
33. Liao, X. et al. Kruppel-like factor 4 regulates macrophage polarization. *J. Clin. Invest.* **121**, 2736–2749 (2011).
34. Luan, B. et al. CREB pathway links PGE2 signaling with macrophage polarization. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **112**, 15642–15647 (2015).

35. Avni, D., Ernst, O., Philosoph, A. & Zor, T. Role of CREB in modulation of TNF α and IL-10 expression in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. *Mol. Immunol.* **47**, 1396–1403 (2010).
36. Boutens, L. & Stienstra, R. Adipose tissue macrophages: going off track during obesity. *Diabetologia* **59**, 879–894 (2016).
37. Kwok, K. H., Lam, K. S. & Xu, A. Heterogeneity of white adipose tissue: molecular basis and clinical implications. *Exp. Mol. Med.* **48**, e215 (2016).
38. Qiu, Y. et al. Eosinophils and type 2 cytokine signaling in macrophages orchestrate development of functional beige fat. *Cell* **157**, 1292–1308 (2014).
39. Fabbiano, S. et al. Caloric restriction leads to browning of white adipose tissue through Type 2 immune signaling. *Cell Metab.* **24**, 434–446 (2016).
40. Hui, X. et al. Adiponectin enhances cold-induced browning of subcutaneous adipose tissue via promoting M2 macrophage proliferation. *Cell Metab.* **22**, 279–290 (2015).
41. Fujisaka, S. et al. Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice. *Diabetes* **58**, 2574–2582 (2009).
42. Odegaard, J. I. et al. Alternative M2 activation of Kupffer cells by PPAR δ ameliorates obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab.* **7**, 496–507 (2008).
43. Mills, E. L., Kelly, B. & O'Neill, L. A. J. Mitochondria are the powerhouses of immunity. *Nat. Immunol.* **18**, 488–498 (2017).
44. Trauelsen, M. et al. Receptor structure-based discovery of non-metabolite agonists for the succinate receptor GPR91. *Mol. Metab.* **6**, 1585–1596 (2017).
45. Mauer, J. et al. Signaling by IL-6 promotes alternative activation of macrophages to limit endotoxemia and obesity-associated resistance to insulin. *Nat. Immunol.* **15**, 423–430 (2014).
46. Reilly, S. M. & Saltiel, A. R. Countering inflammatory signals in obesity. *Nat. Immunol.* **15**, 410–411 (2014).
47. Pellegrinelli, V., Carobbio, S. & Vidal-Puig, A. Adipose tissue plasticity: how fat depots respond differently to pathophysiological cues. *Diabetologia* **59**, 1075–1088 (2016).
48. Carobbio, S., Pellegrinelli, V. & Vidal-Puig, A. Adipose tissue function and expandability as determinants of lipotoxicity and the metabolic syndrome. *Adv. Exp. Med. Biol.* **960**, 161–196 (2017).
49. Lumeng, C. N., DelProposto, J. B., Westcott, D. J. & Saltiel, A. R. Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatio-temporal differences in macrophage subtypes. *Diabetes* **57**, 3239–3246 (2008).
50. Wellen, K. E. & Hotamisligil, G. S. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* **112**, 1785–1788 (2003).

Acknowledgements

This study was supported by grants from the Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities (PI14/00228 and PI17/01503 to J.V., SAF2015-65019-R to S.F.-V.,

SAF2014-56819-R and SAF2015-71878-REDT to A.C., BFU2016-78951-R to G.M.-M., PI15/00143 to C.S. and PI15/01562 to A.M., BFU2015-70454-REDT and BFU2017-90578-REDT to S.F.-V. and G.M.-M.) co-financed by the European Regional Development Fund (ERDF). The Spanish Biomedical Research Center in Diabetes and Associated Metabolic Disorders (CIBERDEM) (CB07708/0012) is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III. N.K. is recipient of a predoctoral fellowship from MINECO, Spain (FPI, BES-2016-077745). C.S. acknowledges support from the 'Ramón y Cajal' program from MINECO (RYC2013-13186) and S.F.-V. the Miguel Servet tenure-track program (CP10/00438 and CP116/00008) from the Fondo de Investigación Sanitaria, co-financed by the ERDF. We want to particularly acknowledge the patients and the BioBank IISPV (PT17/0015/0029) integrated in the Spanish National Biobanks Network for its collaboration. We also thank K. McCreath and A. Cervera for kindly providing the C57BL/6 *Sucnr1^{fl/fl}* mice and for their helpful comments on the manuscript. Finally, we thank IRB Barcelona Functional Genomics Core Facility for Microarray processing and IRB Barcelona Biostatistics and Bioinformatics facility.

Author contributions

J.V. and S.F.-V. conceived, designed and supervised the research project. N.K., V.C.-M. and E.C. participated in the conception and design of the study, sample collection, experiment planning and conduction. C.S. analyzed human metabolic data. M.E. performed flow cytometry data acquisition and analysis of data. M.I.H.-A. carried out transcriptome analysis. J.V.d.I.R. analyzed ChIP-seq genomic data. R.F. and R.J. participated in the human sample recruitment. D.H. provided technical assistance and analysis of data of the metabolic phenotype study in mice. C.N.-R., E.M.-M. and M.M.R. performed cell culture and technical animal procedures assistance. A.Z., A.C., A.M., G.M.-G. and C.S. provided scientific discussion and revised the manuscript. S.F.-V. and J.V. are the guarantors of this work.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0372-7>.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Correspondence and requests for materials should be addressed to J.V. or S.F.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature America, Inc. 2019

Methods

Human cohort. All participants gave their informed consent and the study was reviewed and approved by the Ethics and Research Committee of Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV CElm, Tarragona, Spain), in accordance with Good Clinical Practice Guidelines approved by the Health Department of Generalitat de Catalunya, which met all requirements of the Declaration of Helsinki. Donors were classified as lean or obese based on BMI following World Health Organization criteria. Plasma, scWAT and vWAT were obtained from age- and gender-matched human donors undergoing non-acute surgical interventions, such as hernia or cholecystectomy, in a scheduled routine surgery: lean $n = 15$ (BMI 22.87 ± 1.51); obese $n = 36$ (BMI 31.44 ± 4.55). Anthropometric and biochemical variables from the cohort are represented in Supplementary Table 3.

Mice. Myeloid cell-specific *Sucnr1* knockout mice (*LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}*) were generated by breeding *LysM-Cre* mice (kindly provided by G. Sabio, CNIC, Spain) with *Sucnr1^{fl/fl}* mice. Cre-negative *Sucnr1^{fl/fl}* littermates were used as controls. Mice were genotyped by PCR; genotyping of *Sucnr1^{fl/fl}* mice resulted in a 450-bp product for the *loxP*-targeted allele and a 300-bp product for the wild-type allele. All genotypes were generated on a pure C57BL/6 background. Total *Stat6^{-/-}* mice in a C57BL/6 background were purchased from The Jackson Laboratory. Mice were housed at the Faculty of Medicine and Health Science animal facility, Rovira i Virgili University (URV). Male mice were grouped (five per cage) under controlled conditions of 12 h light/dark cycle at 22°C and ad libitum access to NCD (3.1% fat; SAFE diets, A04) or HFD (45% fat; Research diets, D12451), beginning at 7 weeks of age. All animal studies were supervised and approved by the Universitat Rovira i Virgili Animal Welfare and Ethics Committee. All animal procedures conformed to European Union Directive 86/609/EEC and recommendation 2007/526/EC regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes, enacted under Spanish law 1201/2005.

Indirect calorimetry and activity measurements. Animals were placed in a comprehensive laboratory animal monitoring system (PhenoMaster, TSE Systems) for analysis of metabolic phenotypes of male *Sucnr1^{fl/fl}* and *LysM-Sucnr1^{fl/fl}* mice (at 22°C), and at 22°C, 30°C and 8°C for the cold-exposure study. Airflow rate was 380 ml min⁻¹; O₂ and CO₂ concentrations in room air and air leaving each cage were measured every 15 min. Energy expenditure (kcal h⁻¹ per mouse or kcal h⁻¹ kg⁻¹) was calculated from the amount of O₂ consumed (VO₂, ml h⁻¹ per mouse or ml h⁻¹ kg⁻¹, respectively) and the amount of CO₂ produced (VCO₂) using the equation energy expenditure (J) = 15.818VO₂ + 5.176VCO₂. The respiratory exchange ratio (RER) was calculated from the ratio VCO₂/VO₂. Activity, food and drink intake of each animal was calculated as described³¹. Data for energy expenditure were analyzed using analysis of covariance with body weight as a covariate.

Glucose and insulin tolerance test. After 16 h of fasting, mice were subjected to a glucose-tolerance test (GTT), receiving an intraperitoneal injection of glucose solution (1.5 g glucose per kg body weight). Blood was collected from the tail and glucose was measured using a handheld glucometer (Accu-Chek glucose reader; Roche). To measure insulin levels in response to glucose, blood was collected from tail punctures at 0, 15 and 30 min after injection and insulin was measured using a commercial Mouse Insulin Ultra-Sensitive ELISA (BioVendor). For the intraperitoneal insulin-tolerance test (ITT), mice were fasted for 3 h and injected with insulin (0.75 U kg⁻¹).

Isolation of mature adipocytes, SVF and ATMs. ATMs were isolated from the SVF of human adipose tissue biopsies as described^{52,53}. In brief, scWAT and vWAT was washed extensively with PBS to remove debris and treated with 0.1% collagenase in PBS and 1% BSA for 1 h at 37°C with gentle agitation. Digested samples were centrifuged at 300g at 4°C for 5 min to separate adipocytes from the SVF. Adipocytes were directly used for RNA isolation and the cell pellet containing the SVF was resuspended in red-blood-cell lysis buffer (10 mM KHCO₃, 150 mM NH₄Cl, 0.1 mM EDTA) for 2 min, then washed with PBS and passed through a 40 μm filter (Fisher Scientific). To isolate ultrapure ATMs, the SVF was incubated with F4/80 MicroBeads (130-110-443, MiltenyiBiotec) for 30 min and positive selection was performed with an autoMACS separator (MiltenyiBiotec). Each biologically independent sample was obtained from a pool of six to seven mice (*Sucnr1^{fl/fl}* or *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}*), or two to three human individuals samples (lean or obese).

Isolation and culture of adipose tissue explants. Human adipose tissue samples were obtained as described above. Mouse scWAT and vWAT was freshly isolated and 0.2 g of tissue was placed in 1 ml DMEM/F12 and 10% fetal bovine serum (FBS). Samples were incubated for 24 h at 37°C and 5% CO₂ without or with succinate at 200 μM. Each biologically independent sample was obtained from a pool of two to three mice (*Sucnr1^{fl/fl}* or *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}*), or human individuals samples (lean or obese).

Flow cytometry. The SVF from scWAT and vWAT was isolated as described above. To isolate myeloid lineage cells, SVF was incubated with CD11b MicroBeads (130-049-601, MiltenyiBiotec) for 30 min, and positive selection was performed with an autoMACS separator. Magnetically isolated CD11b⁺ cells were washed and

incubated with the desired combination of fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies, including FITC-anti-F4/80 (clone BM8), APC-anti-CD11c (clone N418), PE-anti-CD206 (clone MR6F3) and PE-Cy7-anti-Ly-6G (clone RB6-8C5) (all from eBiosciences) for 20 min. Data were acquired on a FACS Aria III (BD Biosciences) and analysis was performed using FACSDivaTM software (BD Biosciences).

Isolation and culture of human monocytes. Human PBMCs were isolated using Ficoll-Hypaque gradients (Amersham Bioscience). Monocytes were purified from PBMCs by magnetic cell sorting using CD14-microbeads (MiltenyiBiotec) as described⁵⁴. Human PBMC-derived Mφ were obtained by culturing CD14⁺ cells in RPMI medium supplemented with human recombinant M-CSF or GM-CSF (30 ng ml⁻¹; PeproTech) for 7 d at 37°C, refreshed every 2 d. Each biologically independent sample was obtained from a pool of two to three human individuals samples.

Isolation of peritoneal macrophages. Mice were killed by CO₂ inhalation. Resident peritoneal cells were harvested by lavage with 5 ml ice-cold PBS as described⁵⁵. At 72 h, cells mainly comprised peritoneal macrophages⁵⁶. Macrophages were purified by adherence to tissue culture plates using an established procedure that gives >90% purity⁵⁶. Non-adherent cells were removed by washing twice with PBS. Each biologically independent sample was obtained from a pool of six to seven mice (*Sucnr1^{fl/fl}* or *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}*).

Isolation of BMDMs. BMDMs from 8- to 11-week-old mice were obtained as described⁵⁷. In brief, mice were killed by CO₂ and the femurs and tibiae were collected and ground gently with a sterile mortar in 5 ml ice-cold PBS. Supernatants were collected in ice-cold PBS and filtered through a 70 μm nylon cell strainer to remove solid fragments. The filtrate was centrifuged at 450g for 10 min at 4°C, and pellets were dissociated in 10 ml red-blood-cell lysis buffer for 30 sec. After centrifugation, the pellet was dissociated in 20 ml of RPMI, 10% FBS and 1% antibiotic/antimycotic solution at 37°C, and cultured in 100 mm Petri-dishes for 4 h at 37°C to remove resident bone marrow macrophages by adhesion. Collected supernatants were filtered and centrifuged as described above. Pellets were dissociated in RPMI supplemented with murine recombinant M-CSF or GM-CSF (30 ng ml⁻¹) and harvested after 7 d at 37°C with 5% CO₂. Media and stimuli were refreshed every 2 d. Cells were placed in RPMI medium without stimulus for 24 h before treatments. Differentiation was confirmed by F4/80 expression using flow cytometry (data not shown). Each biologically independent sample was obtained from a pool of six to seven mice (*Sucnr1^{fl/fl}* or *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}*).

THP1 cell culture. The human monocyte THP1 cell line was obtained from the ATCC. Cells were cultured as described⁵³. In brief, cells were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FBS and 1% antibiotic/antimycotic solution in a humidified cell culture incubator at 37°C with 5% CO₂.

Macrophage differentiation and stimulation. To assess gene expression of pro- and anti-inflammatory markers, human PBMCs and murine BMDMs treated with M-CSF were stimulated with *Escherichia coli*-derived lipopolysaccharide (serotype 0111:B4, number L4391, Sigma-Aldrich) (250 ng ml⁻¹) or human or murine recombinant IL-4 (PeproTech) (30 ng ml⁻¹), respectively, for 24 h. For succinate (200 μM), lipopolysaccharide (250 ng ml⁻¹) or IL-4 (30 ng ml⁻¹) treatment of ATMs, peritoneal macrophages and THP1, cells were stimulated for 6 h. For cell-signaling studies, BMDMs^{M-CSF} were untreated or pre-incubated with a PKA inhibitor (H-89; number 037M4702V, Sigma-Aldrich) (50 μM) for 30 min and/or succinate (200 μM) for 2 h and subsequently exposed to IL-4 for the indicated time points. For succinate signaling, cells were untreated or pretreated with H-89 and then stimulated with succinate for the indicated time points.

STAT6 and KLF4 silencing. THP1 cells were transfected with human STAT6 siRNA (number 6778), KLF4 siRNA (number 9314) or a control (non-targeting pool, number 16600) using Dharmafect transfection reagent diluted in Opti-MEM I reduced serum medium (Invitrogen), added to the cultured cells for 48–72 h. BMDMs and ATMs were transfected with mouse STAT6 siRNA (number 20852), KLF4 siRNA (number 16600) or a control (Accell non-targeting pool, number D-001910-1050) using Accell siRNA delivery media (number B-005000-100), added to the cultured cells for 48–72 h. siRNAs were purchased from Dharmacon.

Succinate determination. Succinate levels were measured in plasma from humans and mice and also from conditioned medium from human PBMCs and murine BMDMs after 24 h culture without stimuli with the EnzyChromTM Succinate Assay Kit (BioAssay Systems), as described¹¹. The assay sensitivity was 12 μM and the intra- and interassay co-efficient of variances were less than 3.5 and 6.95%, respectively. Succinate intracellular levels were measured with the Succinate Colorimetric Assay kit (Sigma-Aldrich).

Gene-expression analysis. Total RNA was extracted from tissues/cells using the RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen Science). Total RNA quantity was measured at 260 nm and purity was assessed by the optical density 260 nm/optical

density 280 nm ratio. One microgram of RNA was transcribed to complementary DNA with random primers using the Reverse Transcription System (Applied Biosystems). Quantitative gene expression was evaluated by qPCR on a 7900HT Fast Real-Time PCR System using the TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems) (Supplementary Table 4). Results were calculated using the comparative C_T method ($2^{-\Delta\Delta C_T}$), and expressed relative to the expression of the housekeeping gene 18S for human samples, and beta-2-microglobulin for murine samples.

Microarray analyses. RNA isolation, library preparation and amplification from *Sucnr1*^{fl/fl} and *LysM-Sucnr1*^{fl/fl} ATMs from scWAT and vWAT were performed as described⁵⁸. 8 µg of cDNA was subsequently fragmented, labeled and hybridized to MG-430 PM array strip (Thermo Fisher Scientific, Affymetrix, reference 901570). Processing of microarray samples was carried out using packages *affy*⁵⁹ and *affyplm*⁶⁰ from Bioconductor. Raw cell files were normalized using robust multi-array average (RMA) background correction and summarization⁶¹. Technical metrics PM median, PM interquartile range (IQR), RMA IQR and RNA degradation described in ref.⁶² were computed and recorded as additional features for each sample. Differential expression between conditions was calculated using the moderated *t*-statistic by empirical Bayes shrinkage⁶³. Experiment pool and Eklund metric RMA IQR were included as adjusting variables in the model to correct for technical variability. The normalized expression matrix was adjusted by the effect of the experiment pool and RMA IQR variables. This matrix was scaled and used afterwards to generate individual gene heat maps. The log₂ fold-change information (positive change when *LysM* was higher than flox/flox and negative change when *LysM* was lower than flox/flox) was considered to rank all genes in the genome, and GSEA was performed using the Broad Institute's implementation⁶⁴ on MSigDB Hallmark collections. Hallmark gene sets were translated to mouse homologs using Biomat⁶⁵. Statistically enriched Hallmark gene sets were also identified using the standard hypergeometric test. Significance was defined at levels of adjusted *P* value smaller than four thresholds, that is, 0.25, 0.10, 0.05 and 0.01, using the Benjamini-Hochberg multiple testing correction. Pools of four animals from each genotype (*Sucnr1*^{fl/fl} or *LysM-Cre Sucnr1*^{fl/fl}) were employed to obtain each experiment.

Immunoblot analysis. Cells were lysed and homogenized in M-PER buffer containing Protease Inhibitor Cocktail, and protein concentration was determined with the BCA Protein Assay Kit (both from Pierce Biotechnology). Equal amounts of total protein were separated using SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred to Immobilon membranes and blocked. Immunoblot analysis was performed through the use of polyclonal antibodies against phospho-SAPK/JNK, phospho-CREB, phospho-STAT6, phospho-PKA, STAT6 and KLF4, from Cell Signaling Technology; polyclonal antibodies against IL-10 and a monoclonal antibody for UCP1, from Abcam; polyclonal antibodies against SUCNR1 and GAPDH from Sigma-Aldrich and FAA from Santa Cruz Biotechnology. FAA and GAPDH were used as loading controls. Immunoreactive bands were visualized with SuperSignal West Femto chemiluminescent substrate (Pierce) and images were captured using the VersaDoc imaging system and Quantity One software (BioRad).

Histology. Sections of 5 µm thickness were paraffin-embedded and prepared for hematoxylin and eosin staining or for UCP1 or F4/80 immunohistochemistry. In brief, paraffin sections were de-paraffinized and rehydrated. For UCP1 detection, heat-induced antigen retrieval of sections was carried out using Tris-buffer solution (pH 9) or citrate (pH 6) for F4/80. Slides were blocked 1 h in blocking buffer, incubated at 4 °C overnight with the primary rabbit anti-mouse UCP1 (Abcam) or rat anti-mouse F4/80 (BioRad) antibody, followed by incubation with a donkey anti-rabbit IgG against UCP1 (GE Healthcare) or a goat anti-rat against F4/80 (Vector Laboratories) horseradish peroxidase-conjugated antibody for 90 min at room temperature. Slides were washed thoroughly and coverslips were mounted with DPX mounting medium (Sigma-Aldrich). Sections were observed by microscopy on a Leica DM1000 microscope and image acquisition was performed using Leica microsystems imaging software.

***Sucnr1* promoter study through bioinformatic analysis.** Chromatin immunoprecipitation with sequencing (ChIP-seq) sequencing data from BMDMs, published by Ostuni et al.⁶⁶, were aligned to the University of California Santa Cruz mm9 murine genome using bowtie2 aligner software (v.2.2.9)⁶⁷. Data analysis was performed using HOMER software suite (v.4.9) (<http://homer.ucsd.edu/homer/>) described in Heinz et al.⁶⁸ Each ChIP-seq experiment was normalized to a total number of 10⁷ uniquely mapped tags. Aligned read files were visualized by obtaining snapshot tracks from UCSC Genome browser. To identify STAT6 DNA-binding motifs, we obtained four sequences found in STAT6 binding sites (1,000 bp surrounding STAT6 peaks) from *Sucnr1* (one sequence) and known classic STAT6 targets arginase-1 (two sequences) and chitinase-like protein 3 (one sequence). Sequence motif obtained with MEME-ChIP v.4.12.0 software suite⁶⁹ was interrogated to TOMTOM tool to evaluate similarities to known transcription factor binding motifs. MEME-ChIP *P* value indicates the probability that an equal or better site would be found in a random sequence of the same length conforming to the background letter frequencies; TOMTOM *P* value indicates the probability

that a random motif of the same width as the target would have an optimal alignment with a match score as good or better than the target's. Tomtom estimates the *P* value using a null model consisting of sampling motif columns from all the columns in the set of target motifs.

Statistical analysis. Each experiment was performed two, three or four times and pooled to carry out statistical analysis. For in vitro data, values are reported as mean ± s.e.m. Differences between groups were determined using unpaired *t*-test (two-tailed, 95% confidence interval), and statistical significance in body weight, GTT and ITT curves were tested by two-way analysis of variance, using GraphPad Prism 5 software. *P* < 0.05 was considered significant. For clinical and anthropometrical variables the Kolmogorov-Smirnov test and Shapiro-Wilk test were used to test normality of variables. Normally distributed data were expressed as mean ± s.d., and for variables with no Gaussian distribution values were expressed as median (25th–75th quartiles). Statistical significance was tested by unpaired *t*-test (two-tailed, 95% confidence interval) or Mann-Whitney *U* test. To analyze the differences in nominal variables between groups, we used the χ^2 test. Pearson's and Spearman's correlation coefficients (two-tailed, 95% confidence interval) with Bonferroni adjustment were used to analyze the relationship between parameters. All clinical data were analyzed using Statistical Package for the Social Sciences software, v.15 (SPSS).

Reporting Summary. Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

Data availability

Full scans for all immunoblots and source data for Figs. 1–8 are provided in the Supplementary Information. All other data are available from the corresponding authors upon request. All microarray data are in the GEO database with accession code GSE120121.

References

- Medina-Gomez, G. et al. PPAR gamma 2 prevents lipotoxicity by controlling adipose tissue expandability and peripheral lipid metabolism. *PLoS Genet.* **3**, e64 (2007).
- Ceperuelo-Mallafre, V. et al. Adipose tissue glycogen accumulation is associated with obesity-linked inflammation in humans. *Mol. Metab.* **5**, 5–18 (2016).
- Serena, C. et al. Obesity and Type 2 diabetes alters the immune properties of human adipose derived stem cells. *Stem Cells* **34**, 2559–2573 (2016).
- Maymo-Masip, E. et al. The rise of soluble TWEAK levels in severely obese subjects after bariatric surgery may affect adipocyte-cytokine production induced by TNF α . *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **98**, E1323–E1333 (2013).
- Gilmour, J. S. et al. Local amplification of glucocorticoids by 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 promotes macrophage phagocytosis of apoptotic leukocytes. *J. Immunol.* **176**, 7605–7611 (2006).
- Zhang, X., Goncalves, R. & Mosser, D. M. The isolation and characterization of murine macrophages. *Curr. Protoc. Immunol.* Ch. 14, Unit 11 (2008).
- Trouplin, V. et al. Bone marrow-derived macrophage production. *J. Vis. Exp.* **81**, e50966 (2013).
- Gonzalez-Roca, E. et al. Accurate expression profiling of very small cell populations. *PLoS ONE* **5**, e14418 (2010).
- Gautier, L., Cope, L., Bolstad, B. M. & Irizarry, R. A. *affy*—analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics* **20**, 307–315 (2004).
- Heber, S. & Sick, B. Quality assessment of affymetrix genechip data. *OMICS* **10**, 358–368 (2006).
- Irizarry, R. A. et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* **4**, 249–264 (2003).
- Eklund, A. C. & Szallasi, Z. Correction of technical bias in clinical microarray data improves concordance with known biological information. *Genome Biol.* **9**, R26 (2008).
- Ritchie, M. E. et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* **43**, e47 (2015).
- Subramanian, A. et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102**, 15545–15550 (2005).
- Durinck, S., Spellman, P. T., Birney, E. & Huber, W. Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt. *Nat. Protoc.* **4**, 1184–1191 (2009).
- Ostuni, R. et al. Latent enhancers activated by stimulation in differentiated cells. *Cell* **152**, 157–171 (2013).
- Langmead, B. & Salzberg, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* **9**, 357–359 (2012).
- Heinz, S. et al. Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities. *Mol. Cell* **38**, 576–589 (2010).
- Bailey, T. L. et al. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res.* **37**, W202–W208 (2009).



Preoperative Circulating Succinate Levels as a Biomarker for Diabetes Remission After Bariatric Surgery

Diabetes Care 2019;42:1956–1965 | <https://doi.org/10.2337/dc19-0114>

Victoria Ceperuelo-Mallafre,^{1,2}
Gemma Llaurodo,^{2,3} Noelia Keiran,^{1,2}
Ester Benaiges,^{1,2} Brenno Astiarraga,^{1,2,4}
Laia Martínez,¹ Silvia Pellitero,^{2,5}
Jose Miguel González-Clemente,^{2,6}
Amaia Rodríguez,⁷
José Manuel Fernández-Real,⁴
Albert Lecube,⁸ Ana Megía,^{1,2}
Nuria Vilarrasa,^{2,9} Joan Vendrell,^{1,2,10} and
Sonia Fernández-Veledo^{1,2}

OBJECTIVE

To determine the potential use of baseline circulating succinate to predict type 2 diabetes remission after bariatric surgery.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Forty-five obese patients with diabetes were randomly assigned to Roux-en-Y gastric bypass (RYGB), sleeve gastrectomy (SG), or laparoscopic greater curvature plication. Anthropometric parameters were evaluated, and a complete biochemical analysis including circulating serum succinate concentrations was performed at baseline and 1 year after surgery. The results were externally validated in a second cohort including 88 obese patients with diabetes assigned to RYGB or SG based on clinical criteria.

RESULTS

Succinate baseline concentrations were an independent predictor of diabetes remission after bariatric surgery. Patients achieving remission after 1 year had lower levels of baseline succinate (47.8 [37.6–64.6] $\mu\text{mol/L}$ vs. 64.1 [52.5–82.9] $\mu\text{mol/L}$; $P = 0.018$). Moreover, succinate concentrations were significantly decreased 1 year after surgery (58.9 [46.4–82.4] $\mu\text{mol/L}$ vs. 46.0 [35.8–65.3] $\mu\text{mol/L}$, $P = 0.005$). In multivariate analysis, the best logistic regression model showed that baseline succinate (odds ratio [OR] 11.3, $P = 0.031$) and the type of surgery (OR 26.4, $P = 0.010$) were independently associated with remission. The C-statistic for this model was 0.899 (95% CI 0.809–0.989) in the derivation cohort, which significantly improved the prediction of remission compared with current available scores, and 0.729 (95% CI 0.612–0.846) in the validation cohort. Interestingly, patients had a different response to the type of surgery according to baseline succinate, with significant differences in remission rates.

CONCLUSIONS

Circulating succinate is reduced after bariatric surgery. Baseline succinate levels have predictive value for diabetes remission independently of previously described presurgical factors and improve upon the current available scores to predict remission.

¹Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Endocrinology and Nutrition Service, Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, Tarragona, Spain

²CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM)-Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain

³Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital del Mar, Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (IMIM), Barcelona, Spain

⁴Department of Diabetes, Endocrinology and Nutrition, Institut d'Investigació Biomèdica de Girona, CIBEROBN (CB06/03/010) and ISCIII, Girona, Spain

⁵Department of Endocrinology and Nutrition, Germans Trias i Pujol Research Institute, Barcelona, Spain

⁶Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital de Sabadell, Corporació Sanitària Parc Taulí, Institut d'Investigació i Innovació Parc Taulí (Universitat Autònoma de Barcelona), Sabadell, Spain

⁷Metabolic Research Laboratory, Clínica Universidad de Navarra, CIBEROBN, Instituto de Investigación Sanitaria de Navarra, Pamplona, Spain

⁸Endocrinology and Nutrition Department, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Lleida, Spain

⁹Obesity Unit and Endocrinology and Nutrition Departments, Hospital Universitari de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

¹⁰Rovira i Virgili University, Tarragona, Spain

Corresponding authors: Sonia Fernández-Veledo, sonia.fernandezveledo@gmail.com, and Joan Vendrell, jvo@comt.es

Received 17 January 2019 and accepted 11 July 2019

Clinical trial reg. no. ISRCTN14104758, www.isrctn.org

This article contains Supplementary Data online at <http://care.diabetesjournals.org/lookup/suppl/doi:10.2337/dc19-0114/-/DC1>.

V.C.-M. and G.L. contributed equally to this work, and J.V. and S.F.-V. share senior authorship.

© 2019 by the American Diabetes Association. Readers may use this article as long as the work is properly cited, the use is educational and not for profit, and the work is not altered. More information is available at <http://www.diabetesjournals.org/content/license>.

Bariatric surgery has emerged as an effective treatment for obesity, leading to marked weight loss and the improvement of related comorbidities, such as type 2 diabetes and cardiovascular disease, and reducing mortality (1). Sleeve gastrectomy (SG) is the most commonly performed bariatric procedure because of its simplicity and low rate of complications, accounting for 53.6% of worldwide surgical procedures, followed by Roux-en-Y gastric bypass (RYGB) (30.1%) (2). However, it remains unclear whether RYGB or SG benefits patients with type 2 diabetes equally with regards to glycemic homeostasis (3,4).

Remission rates of type 2 diabetes observed across published series vary, likely due to heterogeneity in the preoperative characteristics of patients. Against this background, several predictive factors for remission have been identified including age, disease duration, baseline C-peptide concentrations, HbA_{1c}, and previous insulin treatment (5–9). Further, remission rates have been associated with greater weight loss after bariatric surgery independently of initial BMI (10). Accordingly, several predictive outcome scores for type 2 diabetes remission have been developed based on these variables to help identify those patients most likely to benefit from surgery (11–14). However, there is limited evidence regarding the optimal candidate for each surgical procedure and relatively few studies have tested these scores in cohorts to predict type 2 diabetes remission following different surgical procedures, such as RYGB and SG, with contradictory results (14–17). Thus, efforts are needed to improve the accuracy to better predict diabetes remission according to the surgical procedures considering malabsorptive or restrictive techniques.

Bariatric surgery is a known potent modifier of key metabolic intermediates, as has been recently demonstrated in animal models and in patients who have undergone RYGB (18–21). In this context, specific circulating and cardiac tricarboxylic acid cycle metabolites have been identified as potential key players in bariatric cardioprotection through the so-called “enterocardiac axis” (19). Among them, succinate has recently emerged as an extracellular signaling metabolite governing local stress and inflammatory processes via engagement with its cognate receptor SUCNR1/

GPR91 (22). Remarkably, elevated levels of circulating succinate have been detected in several high-risk cardiovascular disease states such as hypertension (23), ischemic heart disease (24), and type 2 diabetes (25,26). Along these lines, we recently demonstrated that BMI is a determinant of circulating succinate levels, which are directly linked to specific constituents of fecal microbiota (25). Interestingly, microbiota-produced succinate has also been related to intestinal glucose metabolism (27,28) and metabolic activity of brown adipose tissue (29), which are major pathophysiological mechanisms mediating beneficial metabolic effects of bariatric surgery (30).

Several studies have attempted to identify robust biological and clinical predictors of type 2 diabetes remission after surgery (5–9,31); however, there is still insufficient evidence to define cutoff values able to quantitatively predict remission over time. Here, we postulated that succinate, which occupies a pivotal position in metabolism as both an energetic and a signaling metabolite, plays an important role in glucose metabolism and hence in clinical response after bariatric surgery. Our study aimed to assess whether preoperative circulating levels of succinate might have an impact on type 2 diabetes remission.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Study Design and Patients

The study was completed in the setting of a previously published prospective single-center, nonblinded, randomized controlled trial including obese patients with type 2 diabetes (9). The trial was registered in the ISRCTN registry (ISRCTN14104758). In brief, 45 patients were consecutively recruited among patients undergoing bariatric surgery at the Bellvitge University Hospital Department of Endocrinology. The study was conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki. The local ethics committee study (Comité de Ética de Investigación Clínica [CEIC] del Hospital Universitario de Bellvitge) approved the study, and all subjects gave written informed consent before study entry.

Study Protocol

The study design and protocol have been previously reported in detail (9,31). From May 2012 to February 2014, patients were consecutively randomized to RYGB ($n = 15$), SG ($n = 15$), or laparoscopic greater curvature plication (LGCP) ($n = 15$). The

procedures were performed by the same surgeon and at the same center. A physical examination with determination of anthropometric parameters and a complete biochemical analysis was performed at baseline and at 1 year after surgery.

Laboratory Determinations

Whole blood was stored at 4°C and was centrifuged (2,500 rpm for 20 min) within 2 h to collect serum.

Glucose, cholesterol, and triglycerides were determined using standard enzymatic methods. Plasma insulin was analyzed by immunoassay (Coat-A-Count Insulin; Diagnostic Products, Los Angeles, CA). Fasting C-peptide levels were also analyzed by immunoassay (Immulite 2000 XPI; Siemens Healthcare, Munich, Germany). Circulating serum succinate levels were measured at baseline and 1 year after bariatric surgery using the EnzyChrom Succinate Assay Kit (BioAssay Systems, Hayward, CA). The assay sensitivity was 12 $\mu\text{mol/L}$, the intra- and interassay coefficient of variance was <3.5 and <6.95%, respectively (25), and the accuracy ranged from 1 to 11.5% error (Supplementary Table 1). Circulating succinate levels measured by this fluorimetric assay were previously validated by liquid chromatography–mass spectrometry and nuclear magnetic resonance analysis (25).

Outcomes

The primary outcome was to evaluate the rate of type 2 diabetes remission at 1 year after bariatric surgery. To evaluate the rate of remission after surgery, we used Buse’s consensus criteria, considering complete type 2 diabetes remission if HbA_{1c} was <6% and fasting glucose was <100 mg/dL, in the absence of pharmacologic therapy or ongoing procedures, for a duration of at least 1 year (32).

Models

To assess the suitability of the current scores to predict remission after bariatric surgery, the data were used to calculate the ABCD (patient’s age, BMI, C-peptide level, and duration of type 2 diabetes) (11), Diabetes Remission (DiaRem) (12), Advanced DiaRem (AdDiaRem) (13), and the DiaBetter (14) scores.

Validation Cohort

The prediction model was externally validated in a second independent cohort

of patients with obesity recruited in three Spanish centers (Hospital Germans Trias i Pujol, Hospital Arnau de Vilanova, and Hospital Josep Trueta, Girona, Spain). The local ethics committee study of each center (CEIC del Hospital Germans Trias i Pujol, CEIC del Hospital Arnau de Vilanova, and CEIC del Hospital Universitario de Girona Doctor Josep Trueta) approved the study, and all subjects gave written informed consent before study entry. The validation population consisted of 88 patients with obesity aged between 18 and 60 years, BMI ≥ 35 kg/m², and with type 2 diabetes on hypoglycemic agents alone, insulin, or both. Type 2 diabetes remission was also evaluated at 1 year after bariatric surgery and using Buse's consensus criteria. The indication for the type of surgical procedure (SG or RYGB) was based on clinical criteria.

Sample Size

Taking into account the available sample size of the initial randomized controlled trial of 45 subjects, to obtain an absolute difference of type 2 diabetes remission rates of 50% between groups (low vs. high succinate) and allowing for a type 1 error of 0.05, the number of subjects included in our study provided a statistical power of 94%.

Statistical Analysis

All data were tested for normality using the Shapiro-Wilk test. Data are presented as percentage, mean and SD for normally distributed quantitative variables, or median and 25th–75th percentiles (interquartile range [IQR]) for nonnormally distributed quantitative variables. Nonnormally distributed quantitative variables were used after performing a log₁₀ transformation. Differences between groups were analyzed using the χ^2 test for comparisons of proportions and the unpaired *t* test or the Mann-Whitney *U* test for comparisons of normally and nonnormally distributed quantitative variables, as needed. One-way ANOVA was used to compare groups in the cross-sectional study. The least squares difference test was used for post hoc analyses. The paired *t* test and the Wilcoxon signed rank test were used for paired analysis of the prospective data. Pearson and Spearman correlation coefficients were used to analyze the relationship between parameters, as described. Two-tailed *P* values of <0.05 were considered statistically significant.

Logistic regression analyses were performed to identify the potential role of circulating succinate and the other factors independently related to type 2 diabetes remission after bariatric surgery. All associated variables in the univariate analyses ($0.67 > \text{odds ratio [OR]} > 1.67$ and $P < 0.2$) and those variables known or likely to be associated with remission (based on previous literature) were included in the logistic regression models as potential independent variables. Receiver operating characteristic (ROC) curves, in which sensitivity is plotted as a function of $1 - \text{specificity}$, were developed to assess the predictive value of circulating succinate and compare it with the different scores for the prediction of type 2 diabetes remission. Subsequently, the equality between the different ROC curve areas obtained was tested. In addition, we used classification and regression tree (CART) analysis, which splits the data into segments that are as homogeneous as possible with respect to the dependent variable.

The calculations, figures, and statistical analysis were made using STATA 13.1 for Mac (StataCorp, College Station, TX) and GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). Diagrams of the evolution of type 2 diabetes status were constructed using a Sankey diagram generator (<https://sankey.csaladen.es/>). CART analysis was performed with SPSS 19 software (IBM, Armonk, NY).

RESULTS

Follow-up Study: Design, Clinical and Anthropometric Variables, and Type 2 Diabetes Evolution

A total of 45 obese patients with type 2 diabetes were included in a 1-year follow-up prospective study. Baseline characteristics (Table 1) were similar between the three surgery groups except for BMI, which was slightly but significantly higher in the LGCP group than in the RYGB and SG groups. As expected, weight, BMI, waist circumference, and waist-to-hip ratio were all reduced after bariatric surgery in the three groups, with marked weight loss and reduced BMI in the RYGB group compared with the SG and LGCP groups. Fasting plasma glucose, insulin concentration, and HbA_{1c} were also improved in the three groups, but especially so in the RYGB and SG groups. Moreover, dyslipidemia improved at 1 year after bariatric surgery, with a decrease of

triglycerides levels and an increase of HDL cholesterol (Table 1). Regarding the evolution of type 2 diabetes status 1 year after bariatric surgery, the overall remission rate was 51.1% ($n = 23$): 26.7% in RYGB ($n = 12$), 17.8% in SG ($n = 8$), and 6.7% ($n = 3$) in LGCP. In addition, the total remission rate at the 2-year clinical follow-up was 46.7% ($n = 21$): 24.4% in RYGB ($n = 11$), 15.6% in SG ($n = 7$), and 6.7% ($n = 3$) in LGCP (Fig. 1A).

No differences were found between the three types of surgery for circulating concentrations of succinate at baseline (Table 1). Considering the whole population in the study, circulating concentrations of succinate were significantly reduced at 1 year of follow-up (58.9 [IQR 46.4–82.4] $\mu\text{mol/L}$ vs. 46.00 [IQR 35.8–65.3] $\mu\text{mol/L}$, $P = 0.005$). When the results were analyzed according to the type of surgery, the reduction was only significant for the RYGB group (58.1 [IQR 37.6–82.8] $\mu\text{mol/L}$ vs. 38.6 [IQR 32.4–50.1] $\mu\text{mol/L}$, $P = 0.025$). Consistent with our previous observations in obese subjects (25), circulating concentrations of succinate at baseline were positively associated with glucose ($r = 0.296$, $P = 0.048$), HbA_{1c} ($r = 0.341$, $P = 0.022$), and triglycerides ($r = 0.421$, $P = 0.004$) (Fig. 1B).

Preoperative Levels of Circulating Succinate Are Linked to Type 2 Diabetes Remission Rates at 1 Year After Bariatric Surgery

We next further explored the potential association between serum succinate and type 2 diabetes remission. Notably, those patients achieving remission at 1 year after surgery had lower circulating concentrations of succinate at baseline (47.8 [IQR 37.6–64.6] $\mu\text{mol/L}$ vs. 64.1 [IQR 52.5–82.9] $\mu\text{mol/L}$; $P = 0.018$) (Fig. 2A). To test the value of the basal succinate level to predict remission, we developed the corresponding ROC curve. The C-statistic of basal succinate was 0.710 (95% CI 0.554–0.865) for predicting remission 1 year after bariatric surgery (Fig. 2B). The best cut-off point of succinate, selected based on the Youden index calculation, was 48.1 $\mu\text{mol/L}$ (sensitivity, 91%; specificity, 52%), which was used to classify the cohort.

To assess the validity of succinate as a biomarker to predict diabetes remission, we compared the accuracy of the existing risk scores for predicting type 2 diabetes

Table 1—Clinical and laboratory data for the obese patients with type 2 diabetes before and at 1 and 2 years after bariatric surgery

	All N = 45	RYGB n = 15	SG n = 15	LGCP n = 15	P for trend
Age (years)	49.4 (8.0)	51.1 (7.7)	49.2 (9.2)	49.7 (8.1)	0.827
Sex (male/female), n	15/30	7/8	5/10	3/12	0.361
Type 2 diabetes, n (%)					
Baseline	45 (100)	15 (100)	15 (100)	15 (100)	1.000
1 year	22 (48.9)	3 (20.0)	7 (46.7)	12 (80.0)	0.005
2 years	24 (53.3)	4 (26.7)	8 (53.3)	12 (80.0)	0.016
Treatment, n (%)					
Baseline	45 (100)	15 (100)	15 (100)	15 (100)	1.000
1 year	13 (28.9)	0 (0.0)	6 (40.0)	7 (46.7) [†]	0.005
2 years	15 (33.3)	0 (0.0)	6 (40.0)	9 (60.0) [†]	0.001
Insulin, n (%)					
Baseline	17 (37.8)	5 (33.3)	6 (40.0)	6 (40.0)	0.910
1 year	5 (11.1) [*]	0 (0.0) [*]	3 (20.0) [*]	2 (13.3)	0.343
Duration (years)	7.4 (3.6–13.0)	4.5 (3.1–10)	10.0 (4.2–15.3)	6.9 (3.4–12.9)	0.209
Anthropometric measurements					
Weight (kg)					
Baseline	103.6 (11.0)	103.0 (10.8)	102.3 (10.8)	105.5 (11.9)	0.710
1 year	75.1 (13.4) [*]	66.6 (10.7) [*]	74.9 (10.1) [*]	83.6 (13.6) ^{*†}	0.001
2 years	78.7 (13.8)	70.4 (11.6)	79.3 (12.5)	86.4 (12.9) [†]	0.004
BMI (kg/m ²)					
Baseline	39.5 (1.9)	38.6 (1.9)	39.0 (1.7)	40.9 (1.4) ^{††}	0.001
1 year	28.6 (4.1) [*]	24.9 (3.0) [*]	28.6 (2.5) ^{*f}	32.3 (2.7) ^{††}	<0.001
2 years	30.0 (4.0)	26.3 (3.0)	30.2 (3.1) ^f	33.4 (2.2) ^{††}	<0.001
Waist (cm)					
Baseline	117.9 (7.9)	118.9 (7.6)	117.5 (7.6)	117.3 (8.9)	0.852
1 year	96.0 (9.9) [*]	91.3 (7.9) [*]	93.6 (10.0) [*]	103.5 (7.7) [*]	0.822
Waist-to-hip ratio					
Baseline	0.96 (0.07)	0.97 (0.09)	0.98 (0.07)	0.93 (0.06)	0.184
1 year	0.91 (0.07) [*]	0.93 (0.07) [*]	0.89 (0.07) [*]	0.92 (0.06)	0.217
Blood pressure					
Systolic (mmHg)					
Baseline	134.0 (18.5)	140.8 (19.7)	132 (13.9)	129.1 (20.4)	0.199
1 year	129.0 (19.4)	128.8 (18.7) [*]	126.8 (25.4)	131.2 (14.3)	0.836
Diastolic (mmHg)					
Baseline	81.1 (14.3)	84.5 (13.6)	77.9 (13.7)	80.7 (15.7)	0.457
1 year	77.2 (13.0)	77.7 (12.9)	74.2 (13.5)	79.6 (13.1)	0.543
Glucose homeostasis					
Glucose (mmol/L)					
Baseline	8.5 (6.4–11.6)	8.0 (5.6–11.1)	8.5 (6.4–12.4)	8.8 (6.3–11.6)	0.583
1 year	5.1 (4.5–6.2) [*]	4.5 (4.4–5.0) [*]	5.1 (4.9–6.5) [*]	6.3 (5.5–8.6) ^{*†}	0.029
2 years	5.8 (5–6.9)	5.1 (4.8–5.7)	6.0 (5.3–8.0)	6.9 (5.8–9.3) [†]	0.006
Insulin (pmol/L)					
Baseline	115 (80–137)	132 (115–143)	94 (63–117)	106 (67–128)	0.779
1 year	50 (35–74) [*]	37 (28–71) [*]	42 (36–88) [*]	72 (59–84) [†]	0.021
C-peptide (nmol/L)					
Baseline	1.1 (0.8–1.3)	1.1 (0.7–1.3)	0.8 (0.7–1.4)	1.0 (0.8–1.5)	0.566
1 year	0.6 (0.5–0.8)	0.5 (0.4–0.6)	0.6 (0.5–1.0)	0.8 (0.6–0.9) [†]	0.013
HbA _{1c} (%)					
Baseline	7.2 (6.3–9.3)	6.7 (5.9–9.5)	7.2 (6.4–9.3)	7.5 (6.3–9.8)	0.634
1 year	5.9 (5.4–6.5) [*]	5.4 (4.7–5.5) [*]	5.9 (5.5–6.8) ^{*f}	5.9 (6.3–7.5) ^{*†}	<0.001
2 years	5.8 (5.4–7.5)	5.2 (4.7–5.6)	6.2 (5.5–7.8)	7.4 (5.8–10.2) [†]	<0.001
HbA _{1c} (mmol/mol)					
Baseline	55 (45–78)	50 (41–80)	55 (46–78)	58 (45–84)	0.634
1 year	41 (36–48) [*]	36 (28–37) [*]	41 (37–51) ^{*f}	41 (45–58) ^{*†}	<0.001
2 years	40 (36–58)	33 (28–38)	44 (37–62)	57 (40–88) [†]	<0.001
Lipid profile					
Total cholesterol (mmol/L)					
Baseline	4.76 (4.27–5.38)	4.88 (3.74–5.44)	4.53 (3.89–4.99)	4.88 (4.41–5.66)	0.456
1 year	4.61 (3.95–5.26)	4.04 (3.09–4.37) [*]	5.02 (4.1–5.28) ^f	5.18 (4.77–5.99) [†]	<0.001

Continued on p. 1960

Table 1—Continued

	All N = 45	RYGB n = 15	SG n = 15	LGCP n = 15	P for trend
HDL cholesterol (mmol/L)					
Baseline	1.13 (1.01–1.33)	1.18 (1.02–1.37)	1.12 (1.04–1.30)	1.06 (0.96–1.46)	0.731
1 year	1.46 (1.23–1.60)*	1.35 (1.18–1.46)*	1.48 (1.27–1.64)*	1.54 (1.25–1.69)*	0.075
LDL cholesterol (mmol/L)					
Baseline	2.75 (2.28–3.32)	3.02 (2.14–3.45)	2.53 (2.26–2.89)	2.71 (2.47–3.74)	0.572
1 year	2.60 (2.05–3.26)	2.15 (1.37–2.61)*	2.91 (2.33–3.36)	3.03 (2.43–3.72)†	0.017
Triglycerides (mmol/L)					
Baseline	1.70 (1.17–1.99)	1.70 (1.14–1.99)	1.54 (1.15–1.75)	1.89 (1.22–2.40)	0.424
1 year	0.96 (0.73–1.38)*	0.78 (0.65–1.21)*	0.98 (0.78–1.36)*	1.16 (0.78–2.31)*†	0.045
Succinate					
Circulating (μmol/L)					
Baseline	58.9 (46.4–82.4)	58.1 (37.6–82.8)	48.6 (42.4–79.5)	64.5 (52.3–85.8)	0.318
1 year	46.0 (35.8–65.3)*	38.6 (32.4–50.1)*	44.6 (36.1–54.6)	64.2 (42.0–73.7)	0.056

Quantitative data are presented as mean (SD) or median (25th–75th percentiles), as appropriate. * $P < 0.05$ for the comparison between results 1 year after bariatric surgery vs. baseline. † $P < 0.05$ for least squares difference (LSD) post hoc test comparing SG vs. RYGB. ‡ $P < 0.05$ for LSD post hoc test comparing LGCP vs. RYGB. § $P < 0.05$ for LSD post hoc test comparing LGCP vs. SG.

remission after bariatric surgery with that of circulating succinate. Accordingly, the ABCD, DiaRem, AdDiaRem, and DiaBetter scores were calculated for each patient, and their ROC curves were developed. The C-statistic for the prediction of remission for each of these ROC curves was 0.610 (95% CI 0.447–0.772) for the ABCD score, 0.760 (95% CI 0.616–0.904) for the DiaRem score, 0.728 (95% CI 0.586–0.807) for the AdDiaRem score, and 0.751 (95% CI 0.606–0.896) for the DiaBetter score, which were all similar to the predictive value of baseline circulating succinate alone (Fig. 2B).

We developed logistic regression models to evaluate the independent factors associated with type 2 diabetes remission at 1 year in our cohort. In univariate analysis, and in accord with previous studies (5–8), we found that the variables associated with remission were the type of surgery (malabsorptive vs. restrictive) (OR 6.909, $P = 0.010$), previous insulin treatment (OR 0.146, $P = 0.011$), baseline HbA_{1c} (OR 0.606, $P = 0.011$), and baseline circulating succinate $<48.1 \mu\text{mol/L}$ (OR 10.909, $P = 0.005$). The best logistic regression model obtained showed that baseline circulating succinate $<48.1 \mu\text{mol/L}$ (OR 11.3, $P = 0.031$) and the type of surgery (OR 26.4, $P = 0.010$) were independently associated with remission after adjusting for potential confounders (Table 2). Remarkably, the C-statistic for this model (which we term DiaSuc) was 0.899 (95% CI 0.809–0.989) (Fig. 2C), which significantly improves upon type 2 diabetes prediction by the ABCD score (0.610

vs. 0.899, $P = 0.001$) and the AdDiaRem score (0.728 vs. 0.899; $P = 0.018$) and was slightly but not significantly better than that of the DiaRem score (0.760 vs. 0.899, $P = 0.061$) and the DiaBetter score (0.751 vs. 0.899, $P = 0.052$) (Fig. 2D).

To confirm these results, we performed a regression tree (CART) analysis (Supplementary Fig. 1). We included all of the previously selected variables as predictors of type 2 diabetes remission (see the logistic regression model, Table 2). The first node was split based on the most important predictor, which was considered the preoperative levels of circulating succinate. According to this model, those patients with low baseline succinate ($<48.1 \mu\text{mol/L}$) had a higher percentage of remission at 1 year after bariatric surgery compared with those patients with high baseline succinate (85.7% vs. 35.5%, $P = 0.003$) (Supplementary Fig. 1). The second node was split based on the type of surgery (restrictive vs. malabsorptive). Interestingly, those patients with low baseline succinate had a similar rate of remission independently of the type of surgery (100.0% vs. 75.0%, $P = 0.473$). By contrast, patients with high baseline succinate who underwent malabsorptive surgery had a higher rate of remission at 1 year after bariatric surgery than those who underwent a restrictive procedure (66.7% vs. 22.7%, $P = 0.038$) (Supplementary Fig. 1).

Next, we extended the clinical follow-up to 2 years after bariatric surgery to confirm the potential role of basal succinate levels as a predictor of remission. As mentioned above, 46.7% of patients

achieved complete type 2 diabetes remission ($n = 21$). At this time point, and according to the results at 1 year, those patients who achieved remission at 2 years after surgery had lower circulating concentrations of succinate at baseline (47.6 [IQR 37.6–64.7] $\mu\text{mol/L}$ vs. 63.8 [IQR 55.0–82.9] $\mu\text{mol/L}$, $P = 0.013$). The C-statistic of DiaSuc for predicting remission at 2 years after bariatric surgery, including baseline circulating succinate concentrations and type of surgery, was 0.912 (95% CI 0.821–1.000), which again significantly improved upon the ABCD score (0.620 vs. 0.912, $P < 0.001$), the DiaBetter score (0.710 vs. 0.912, $P = 0.025$), and the DiaRem score (0.755 vs. 0.912, $P = 0.042$), and was slightly better (but not significantly) than the AdDiaRem score (0.774 vs. 0.912, $P = 0.055$) (Fig. 2E).

Finally, the results were externally validated in a second independent cohort (baseline characteristics are reported in Supplementary Table 2). In the validation cohort, the baseline circulating concentration of succinate was 53.2 (IQR 32.0–73.9) $\mu\text{mol/L}$. Circulating concentrations of succinate 1 year after surgery were available in 55 of 88 patients included in the validation cohort. The results obtained in the validation cohort ($n = 55$, 100% SG) also showed a decrease in succinate concentrations 1 year after bariatric surgery (42.3 [IQR 26.6–63.7] $\mu\text{mol/L}$ vs. 34.9 [IQR 26.9–48.2] $\mu\text{mol/L}$, $P = 0.029$). The external validation of the DiaSuc model in this second cohort showed a very good discrimination, with a C-statistic of 0.729 (95% CI 0.612–0.846) (Fig. 2F).

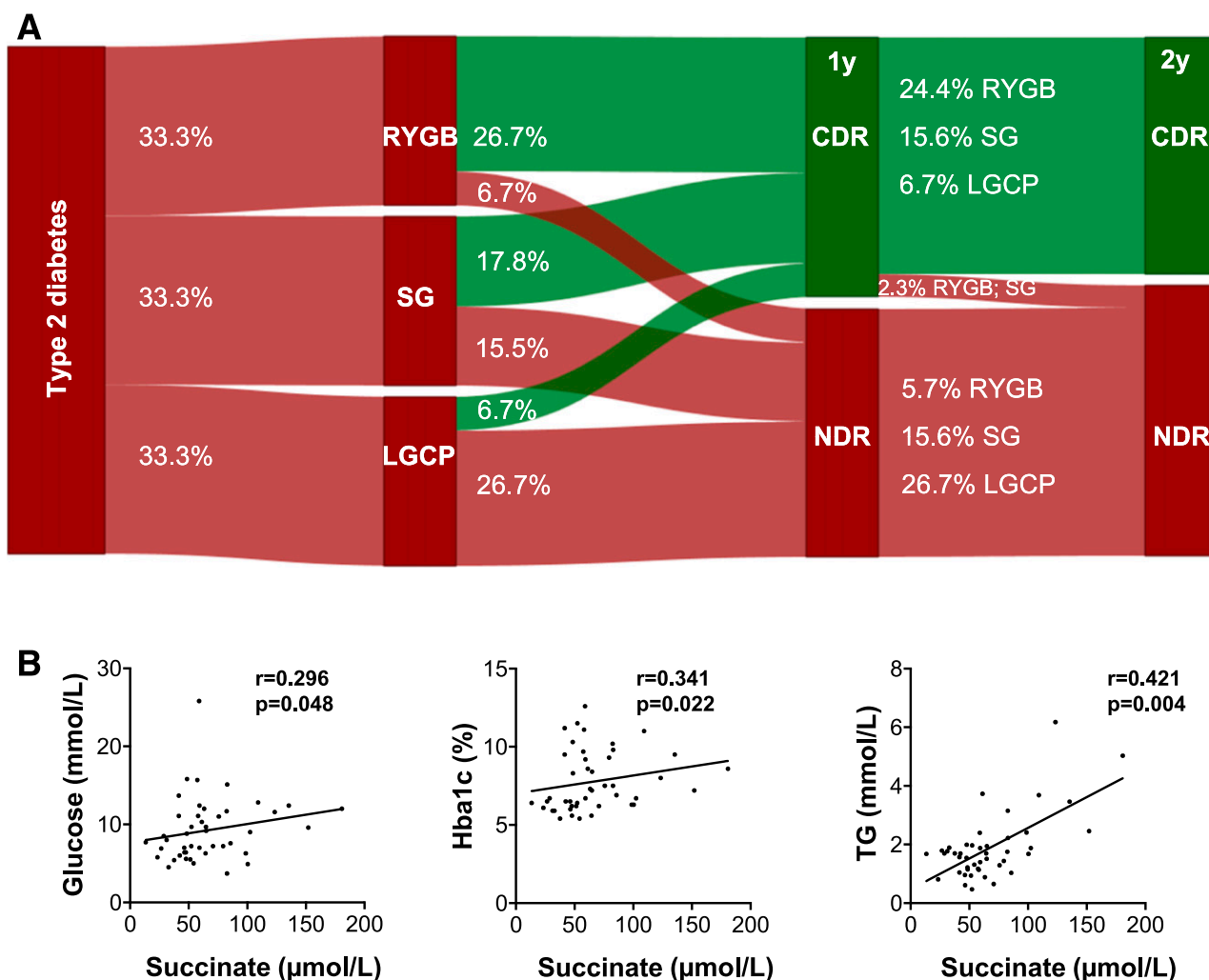


Figure 1—Follow-up study. Type 2 diabetes evolution and baseline succinate associations. *A*: Evolution of type 2 diabetes status throughout the 2-year clinical follow-up and before and 1 year and 2 years after bariatric surgery. The cohort is distributed according to the type of surgery (LGCP, RYGB, or SG). Complete diabetes remission (CDR) and no diabetes remission (NDR) at 1 and 2 years were defined according to Buse’s consensus group criteria. Percentage values are represented vs. total ($n = 45$). Green represents patients achieving CDR and red those who remained NDR during the postbariatric surgery follow-up. *B*: Positive correlation between baseline succinate levels and glucose, HbA_{1c}, and triglycerides in the entire cohort. Spearman correlation analysis was used.

CONCLUSIONS

In the present study, we provide the first demonstration that baseline circulating concentrations of succinate are an independent predictor of type 2 diabetes remission after bariatric surgery in obese patients. Further, baseline circulating concentrations of succinate together with the type of surgery improve upon the accuracy of established predictive diabetes remission scores (11–14).

Bariatric surgery is well established as an effective weight loss strategy for people with obesity that also improves comorbidities. Increasing evidence indicates that it can be a more effective treatment for a subset of patients with type 2 diabetes than standard medical therapy, achieving greater metabolic

effects, such as improving glucose homeostasis, insulin sensitivity, β -cell function, and incretin response, which has led to the term “metabolic surgery” (30,33–35). Using surgery as an intervention for type 2 diabetes, however, implies conceptual and practical differences from the traditional practice of bariatric surgery for obesity, for instance, in the criteria used to select candidates for metabolic surgery, including metrics of metabolic disease severity and predictors of treatment success. In this sense, some predictive presurgical factors of metabolic outcomes have been identified, such as younger age, shorter disease duration, preoperative C-peptide levels, and the absence of insulin treatment before surgery, which are all associated with higher

remission rates (5–9). Accordingly, several predictive remission scores (ABCD, DiaRem, AdDiaRem, and DiaBetter) have been developed incorporating these factors (11–14). Nevertheless, the predictive models do not always consider the different types of surgery. Thus, there is still the need to discover novel biomarkers to better predict remission outcomes.

We previously demonstrated a link between circulating succinate and poor metabolic control in patients with type 2 diabetes (25). In the present study, baseline circulating succinate was associated with type 2 diabetes remission at 1 and 2 years after bariatric surgery (the lower the value, the higher the remission rate), and the predictive value of succinate alone was similar to

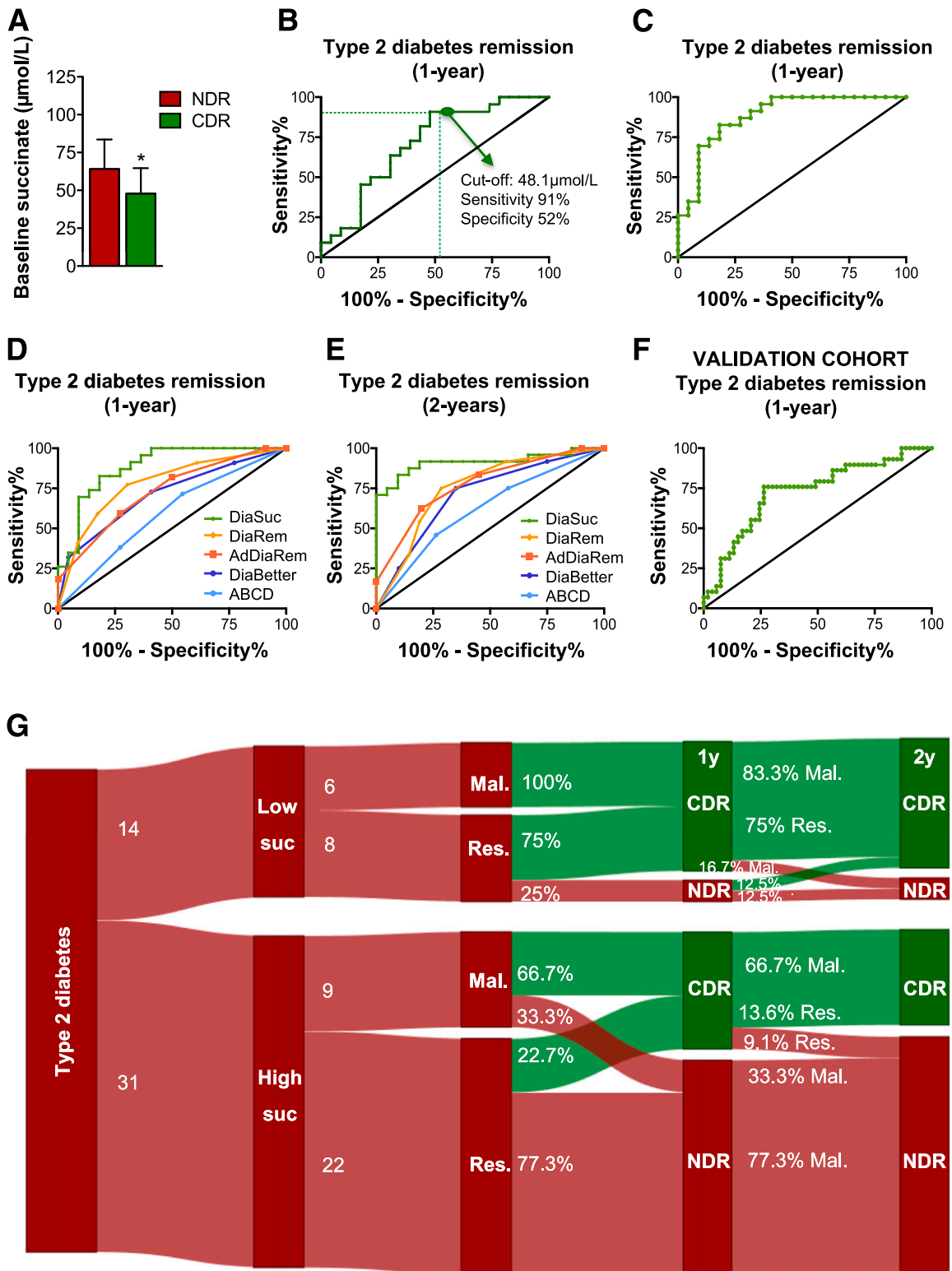


Figure 2—Preoperative levels of circulating succinate are an independent predictor of type 2 diabetes remission after bariatric surgery. **A**: Baseline serum succinate (suc) in patients with complete diabetes remission (CDR) and patients with no diabetes remission (NDR) at 1 year after bariatric surgery. Results are expressed as median with IQR. * $P < 0.05$ by Mann-Whitney test. The ROC curves for succinate (**B**), DiaSuc (**C**), and DiaSuc, DiaRem, AdDiaRem, DiaBetter, and ABCD in predicting diabetes 1 year after bariatric surgery (**D**) and in predicting diabetes 2 years after bariatric surgery (**E**). **F**: ROC curves for DiaSuc in predicting diabetes 1 year after bariatric surgery in the validation cohort. **G**: Evolution of type 2 diabetes status throughout the 2-year clinical follow-up and before and 1 year and 2 years after bariatric surgery. The cohort is distributed according to the cutoff point of circulating baseline succinate, 48.1 $\mu\text{mol/L}$ (low/high), and the type of surgery (restrictive [Res] or malabsorptive [Mal]). Percentage values are represented vs. the number of patients for each group. Green represents patients achieving CDR and red those who remained NDR during the postbariatric surgery follow-up.

Table 2—Logistic regression model for the prediction of complete type 2 diabetes remission

	Logistic regression ($\chi^2 = 27.51, P = 0.001$)				
	Coefficient	SE	95% CI	OR	P
Baseline succinate	2.423	1.126	0.217–4.269	11.3	0.031
Type of surgery	3.274	1.272	0.781–5.768	26.4	0.010

Variables included in the model: age, sex, previous treatment on insulin, baseline HbA_{1c}, circulating baseline succinate <48.1 $\mu\text{mol/L}$ (no/yes), and type of surgery (restrictive vs. malabsorptive).

all of the aforementioned established scores. Moreover, baseline circulating succinate was independently associated with remission after adjusting for the remainder of the predictive presurgical factors, and the logistic regression model tested (which includes baseline succinate and type of surgery) improved the score accuracy to predict remission rates compared with the other models. Considering that the established scores to predict remission generally combine clinical variables mostly related to diabetes severity, our results point to succinate as a metabolite capable of representing several components of metabolic status, rendering a broader view of homeostasis in an easily measurable serum biomarker. Accordingly, succinate could be a new preoperative predictive factor of type 2 diabetes remission after metabolic surgery. Along this line, succinate has been recognized as a predictor of death in critically injured patients and as a marker of hypoxic metabolic reprogramming in cancer, ischemia, inflammation, and immunomodulation (36).

Succinate is traditionally considered as an energetic metabolite produced by both host (mitochondria) and microbiota (25,27). Unfortunately, fecal samples were not available to explore the relationship between circulating succinate and the gut microbiome in the context of bariatric surgery. Nonetheless, one might speculate that mitochondrial dysfunction of metabolic tissues also underlies changes in circulating levels of succinate. Indeed, this metabolite is a good marker of cellular status, because it occupies a pivotal position in metabolism as the only direct link between the tricarboxylic acid cycle and the mitochondrial respiratory chain through complex II activity. When cells rely on certain stress stimuli, mitochondrial levels and, consequently, extracellular levels of succinate might increase (37). While intracellular succinate is commonly considered a proinflammatory stimulus (22), we recently demonstrated that

engagement with its receptor SUCNR1 has a critical role in the anti-inflammatory responses in macrophages, but this interaction is disrupted in obesity. Obesity is defined by high circulating levels of succinate; however, adipose tissue-resident macrophages from obese subjects show decreased expression of SUCNR1, suggesting a “succinate-resistant state” (38). Succinate resistance in the context of obesity might contribute to the increased baseline succinate levels and to the inability to resolve inflammation and glucose homeostasis after bariatric surgery.

Metabolic functions are reduced in insulin-responsive tissues (muscle and adipose tissue) in obesity and type 2 diabetes. No consensus has thus far been reached about whether insulin resistance is a result of reduced mitochondrial density or whether it is the cause or consequence of mitochondrial dysfunction. The debate on mitochondrial dysfunction as a contributor to type 2 diabetes pathogenesis continues and drives the need for more studies on mitochondrial function in this patient group (39). Moreover, it has been reported that destabilized mitochondrial metabolism in type 2 diabetes and obesity can be influenced by bariatric surgery (40). Therefore, despite the unresolved question concerning the source of circulating succinate levels, our results point to this energetic metabolite as a key player in type 2 diabetes remission after bariatric surgery and a new variable to reflect metabolic disease severity.

It remains unclear whether RYGB or SG has equal benefits for patients with type 2 diabetes regarding glycemic homeostasis. Given that both techniques are different with regard to the surgical procedures, postoperative care, long-term comorbidities, and economic costs, it is important to uncover novel biomarkers to adopt a personalized approach to bariatric surgery by identifying which patients will benefit most from

malabsorptive versus restrictive procedures. In that sense, we found that the remission rates were similar independently of the type of surgery (malabsorptive vs. restrictive) for those patients with low baseline circulating succinate (100% vs. 75% at 1 year and 83% vs. 75% at 2 years) (Fig. 2G). By contrast, for those patients with high baseline circulating succinate, the remission rates clearly differed according to the surgical procedure (66.7% vs. 22.7% at 1 year and 67.7% vs. 13.6% at 2 years) (Fig. 2G). Thus, our results suggest that preoperative concentrations of circulating succinate could be a useful metric to determine the best-suited surgical procedure.

We are aware that our study has some limitations. It was a single-center, single-surgeon study, and the sample size was small, although this was supported by the sample size calculations. Importantly, the results were validated in a second independent cohort. Despite randomization, RYGB patients had a tendency toward a more favorable initial metabolic profile, although not reaching statistical significance, and this fact may have conditioned the better metabolic outcomes. In addition, we acknowledge that remission of type 2 diabetes can be also associated with the initial BMI and with a greater weight loss after bariatric surgery. In this sense, we did not find any association between baseline BMI and type 2 diabetes remission. We aimed to identify a potential biomarker that might help to develop a clinical decision tree to select the best-suited surgical procedure, focusing only on presurgical factors. Finally, the follow-up was at 2 years; however, the cohorts allocated to the different bariatric procedures will be closely monitored at long-term.

In conclusion, the present study shows that baseline circulating concentrations of succinate have predictive value for type 2 diabetes remission, independently of previously described presurgical factors, improving upon the current available scores to predict remission. Furthermore, we propose a cutoff value of succinate as a new criterion to select the best candidates for restrictive surgical procedures over the more aggressive malabsorptive surgical techniques in type 2 diabetes. We are fully aware that despite the good agreement of the succinate cutoff values in two independent cohorts from four

different centers, further randomized controlled studies will be needed as a next step to establish the use of succinate as a clinical decision support tool for selecting the best-suited bariatric surgical procedures. Furthermore, as with any diagnostic test, standardizing blood collection and processing protocols to incorporate succinate measurements into routine clinical practice will be essential. Our findings underscore the importance of circulating metabolites as potentially valuable predictive factors of diabetes remission after bariatric surgery. In this sense, although other metabolites cannot be excluded, our results, together with the unique and specific attributes of succinate—its pivotal position in energy metabolism, its role as a fuel substrate and signaling metabolite, and the fact that it is produced by both host and gut microbiota—make it an attractive target for management of diabetes.

Acknowledgments. The authors particularly acknowledge the patients and the BioBank Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV) (PT17/0015/0029) integrated in the Spanish National Biobanks Network for its collaboration.

Funding. This study was supported by grants from Instituto de Salud Carlos III (PI15/01562 to A.M., PI14/01997 and PI17/01556 to N.V., and PI14/00228 and PI17/0153 to J.V.) and Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (BFU2015-70454-REDT and BFU2017-90578-REDT to J.M.F.-R. and S.F.-V. and SAF2015-65019-R and RTI2018-093919 to S.F.-V.), and was cofinanced by the European Regional Development Fund. The Spanish CIBERDEM (CB07708/0012) is an initiative of Instituto de Salud Carlos III. N.K. is recipient of a predoctoral fellowship from the Ministry of Economy and Competitiveness, Spain (FPI, BES-2016-077745), and S.F.-V. is recipient of the Miguel Servet tenure-track program (CP10/00438 and CPII16/00008) from Fondo de Investigación Sanitaria, cofinanced by the European Regional Development Fund.

Duality of Interest. No potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

Author Contributions. V.C.-M. and G.L. participated in the conception and design of the study, sample collection, and statistical analysis and wrote the manuscript. N.K. and B.A. analyzed serum succinate levels. E.B. constructed diagrams of the evolution of type 2 diabetes. L.M., S.P., J.M.G.-C., and A.M. provided scientific discussion and revised the manuscript. A.R., J.M.F.-R., and A.L. participated in the human sample recruitment of the validation cohort. N.V. participated in the human sample recruitment and conducted the clinical trial. J.V. and S.F.-V. conceived, designed, and supervised the research project and wrote the manuscript. J.V. and S.F.-V. are the guarantors of this work and,

as such, had full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

References

- Schauer PR, Mingrone G, Ikramuddin S, Wolfe B. Clinical outcomes of metabolic surgery: efficacy of glycemic control, weight loss, and remission of diabetes. *Diabetes Care* 2016;39:902–911
- Angrisani L, Santonicola A, Iovino P, et al. IFSO Worldwide Survey 2016: primary, endoluminal, and revisional procedures. *Obes Surg* 2018;28:3783–3794
- Kashyap SR, Daud S, Kelly KR, et al. Acute effects of gastric bypass versus gastric restrictive surgery on beta-cell function and insulinotropic hormones in severely obese patients with type 2 diabetes. *Int J Obes* 2010;34:462–471
- Fernández-Soto ML, Martín-Leyva A, González-Jiménez A, et al. Remission of type 2 diabetes mellitus after bariatric surgery - comparison between procedures. *Endokrynol Pol* 2017;68:18–25
- Hall TC, Pellen MG, Sedman PC, Jain PK. Preoperative factors predicting remission of type 2 diabetes mellitus after Roux-en-Y gastric bypass surgery for obesity. *Obes Surg* 2010;20:1245–1250
- Hamza N, Abbas MH, Darwish A, Shafeek Z, New J, Ammori BJ. Predictors of remission of type 2 diabetes mellitus after laparoscopic gastric banding and bypass. *Surg Obes Relat Dis* 2011;7:691–696
- Dixon JB, Chuang LM, Chong K, et al. Predicting the glycemic response to gastric bypass surgery in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2013;36:20–26
- Wang GF, Yan YX, Xu N, et al. Predictive factors of type 2 diabetes mellitus remission following bariatric surgery: a meta-analysis. *Obes Surg* 2015;25:199–208
- Casajoana A, Pujol J, Garcia A, et al. Predictive value of gut peptides in T2D remission: randomized controlled trial comparing metabolic gastric bypass, sleeve gastrectomy and greater curvature plication. *Obes Surg* 2017;27:2235–2245
- Kadera BE, Lum K, Grant J, Pryor AD, Portenier DD, DeMaria EJ. Remission of type 2 diabetes after Roux-en-Y gastric bypass is associated with greater weight loss. *Surg Obes Relat Dis* 2009;5:305–309
- Lee WJ, Almulaifi A, Tsou JJ, Ser KH, Lee YC, Chen SC. Laparoscopic sleeve gastrectomy for type 2 diabetes mellitus: predicting the success by ABCD score. *Surg Obes Relat Dis* 2015;11:991–996
- Still CD, Wood GC, Benotti P, et al. Preoperative prediction of type 2 diabetes remission after Roux-en-Y gastric bypass surgery: a retrospective cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2014;2:38–45
- Aron-Wisniewsky J, Sokolovska N, Liu Y, et al. The advanced-DiaRem score improves prediction of diabetes remission 1 year post-Roux-en-Y gastric bypass. *Diabetologia* 2017;60:1892–1902
- Pucci A, Tymoszuk U, Cheung WH, et al. Type 2 diabetes remission 2 years post Roux-en-Y gastric bypass and sleeve gastrectomy: the role of the weight loss and comparison of DiaRem and DiaBetter scores. *Diabet Med* 2018;35:360–367

- Aminian A, Brethauer SA, Andalib A, et al. Individualized metabolic surgery score: procedure selection based on diabetes severity. *Ann Surg* 2017;266:650–657
- Praveen Raj P, Bhattacharya S, Saravana Kumar S, et al. Do bariatric surgery-related type 2 diabetes remission predictors add clinical value? A study on Asian Indian obese diabetics. *Obes Surg* 2017;27:2113–2119
- Naitoh T, Kasama K, Seki Y, et al. Efficacy of sleeve gastrectomy with duodenal-jejunal bypass for the treatment of obese severe diabetes patients in Japan: a retrospective multicenter study. *Obes Surg* 2018;28:497–505
- Li JV, Ashrafian H, Bueter M, et al. Metabolic surgery profoundly influences gut microbial-host metabolic cross-talk. *Gut* 2011;60:1214–1223
- Ashrafian H, Li JV, Spagou K, et al. Bariatric surgery modulates circulating and cardiac metabolites. *J Proteome Res* 2014;13:570–580
- Lopes TI, Geloneze B, Pareja JC, Calixto AR, Ferreira MM, Marsaioli AJ. Blood metabolome changes before and after bariatric surgery: a (1)H NMR-based clinical investigation. *OMICS* 2015;19:318–327
- Arora T, Velagapudi V, Pournaras DJ, et al. Roux-en-Y gastric bypass surgery induces early plasma metabolomic and lipidomic alterations in humans associated with diabetes remission. *PLoS One* 2015;10:e0126401
- Husted AS, Trauelsen M, Rudenko O, Hjorth SA, Schwartz TW. GPCR-mediated signaling of metabolites. *Cell Metab* 2017;25:777–796
- Sadagopan N, Li W, Roberds SL, et al. Circulating succinate is elevated in rodent models of hypertension and metabolic disease. *Am J Hypertens* 2007;20:1209–1215
- Aguar CJ, Rocha-Franco JA, Sousa PA, et al. Succinate causes pathological cardiomyocyte hypertrophy through GPR91 activation. *Cell Commun Signal* 2014;12:78
- Serena C, Ceperuelo-Mallafre V, Keiran N, et al. Elevated circulating levels of succinate in human obesity are linked to specific gut microbiota. *ISME J* 2018;12:1642–1657
- van Diepen JA, Robben JH, Hooiveld GJ, et al. SUCNRI-mediated chemotaxis of macrophages aggravates obesity-induced inflammation and diabetes. *Diabetologia* 2017;60:1304–1313
- De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Zitoun C, Duchamp A, Bäckhed F, Mithieux G. Microbiota-produced succinate improves glucose homeostasis via intestinal gluconeogenesis. *Cell Metab* 2016;24:151–157
- Kovatcheva-Datchary P, Nilsson A, Akrami R, et al. Dietary fiber-induced improvement in glucose metabolism is associated with increased abundance of *Prevotella*. *Cell Metab* 2015;22:971–982
- Mills EL, Pierce KA, Jedrychowski MP, et al. Accumulation of succinate controls activation of adipose tissue thermogenesis. *Nature* 2018;560:102–106
- Koliaki C, Liatis S, le Roux CW, Kokkinos A. The role of bariatric surgery to treat diabetes: current challenges and perspectives. *BMC Endocr Disord* 2017;17:50
- Ejarque M, Borlaug M, Villarrasa N, et al. Angiotensin-like protein 8/betatrophin as a new determinant of type 2 diabetes remission after bariatric surgery. *Transl Res* 2017;184:35–44.e4

32. Buse JB, Caprio S, Cefalu WT, et al. How do we define cure of diabetes? *Diabetes Care* 2009; 32:2133–2135
33. Ashrafian H, Athanasiou T, Li JV, et al. Diabetes resolution and hyperinsulinaemia after metabolic Roux-en-Y gastric bypass. *Obes Rev* 2011;12:e257–e272
34. Samczuk P, Hady HR, Adamska-Patrano E, et al. In-and-out molecular changes linked to the type 2 diabetes remission after bariatric surgery: an influence of gut microbes on mitochondria metabolism. *Int J Mol Sci* 2018;19:3744
35. Nannipieri M, Mari A, Anselmino M, et al. The role of beta-cell function and insulin sensitivity in the remission of type 2 diabetes after gastric bypass surgery. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:E1372–E1379
36. D'Alessandro A, Moore HB, Moore EE, et al. Plasma succinate is a predictor of mortality in critically injured patients. *J Trauma Acute Care Surg* 2017;83:491–495
37. Correa PR, Kruglov EA, Thompson M, Leite MF, Dranoff JA, Nathanson MH. Succinate is a paracrine signal for liver damage. *J Hepatol* 2007;47:262–269
38. Keiran N, Ceperuelo-Mallafre V, Calvo E, et al. SUCNR1 controls an anti-inflammatory program in macrophages to regulate the metabolic response to obesity. *Nat Immunol* 2019; 20:581–592
39. Schrauwen P, Hesselink MK. Reduced tricarboxylic acid cycle flux in type 2 diabetes mellitus? *Diabetologia* 2008;51:1694–1697
40. Dankel SN, Staalesen V, Bjørndal B, Berge RK, Mellgren G, Burri L. Tissue-specific effects of bariatric surgery including mitochondrial function. *J Obes* 2011;2011:435245

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

En los últimos años, el eje succinato-SUCNR1 ha cobrado especial interés por su demostrada implicación en diversas patologías inflamatorias crónicas^{138,181,182,187,188,190}, incluyendo enfermedades de tipo metabólicas como la obesidad y la T2D, así como sus comorbilidades^{139,165–167,186,221}. Son diversos los estudios que demuestran que en condiciones de estrés oxidativo la alteración en el funcionamiento del TCA conduce a la liberación de succinato de la mitocondria al citosol, y posteriormente al medio extracelular, pudiendo relacionar el incremento a nivel sistémico con diversas situaciones patológicas como las anteriormente mencionadas. Por otro lado, también es bien sabido el efecto que ejerce el succinato intracelular en la estimulación de la síntesis de insulina por parte de la célula β del páncreas^{200–202}, así como también, su reciente papel positivo en la termogénesis del BAT²⁰⁴. A nivel de receptor también se ha descrito que interviene en la remodelación del músculo esquelético²¹⁷ y el mantenimiento del sistema RAS¹⁸⁶. Por lo que el succinato más allá de su participación descrita en situación de inflamación, podría también cumplir funciones clave en el mantenimiento de la fisiología de una gran variedad de procesos en el organismo.

La inflamación estimula el incremento de los niveles de succinato circulantes, promoviendo concentraciones plasmáticas suficientes como para inducir la activación del receptor SUCNR1 de forma específica¹³⁶. Entre las funciones mediadas por este metabolito, se encuentra la activación de la respuesta inmune e inflamatoria^{137,149,183,222}, motivo por el que durante mucho tiempo se le había considerado como un simple mediador de la inflamación¹²⁹. Sin embargo, nuestro estudio, junto a otros recientes^{184,189,223}, han puesto de manifiesto la implicación del eje succinato-SUCNR1 en diversos procesos involucrados en la resolución natural de la inflamación.

Concretamente, nuestra investigación pone en evidencia la relevancia del eje succinato-SUCNR1 en la regulación del fenotipo y funcionalidad de los macrófagos. En este contexto, demostramos por primera vez su implicación en el desarrollo del programa antiinflamatorio, así como parte de los componentes moleculares involucrados en la cascada de señalización de SUCNR1 en estas células. Asimismo, proponemos un nuevo mecanismo implicado en el mantenimiento de la inflamación crónica asociada a la obesidad, a través de un estado de resistencia a la acción antiinflamatoria del succinato. Estos datos apoyan a estudios previos, que sugieren que una de las principales causas de esta inflamación crónica se debe a la incapacidad de generar una respuesta resolutive adecuada durante la obesidad^{224–226}. Por otro lado, nuestro trabajo revela al succinato circulante como un excelente marcador del estado metabólico del sujeto, y postula la utilidad del mismo en la elaboración de modelos de predicción de remisión de T2D tras cirugía bariátrica, así como en la selección de pacientes en relación a la cirugía de destino.

Todo ello ha permitido crear una nueva visión del succinato, como una molécula dual con función determinante en la modulación de la respuesta inflamatoria actuando a la vez como alarmina y resolvina, con gran potencial como biomarcador y herramienta clínica en el contexto de la obesidad y la T2D²²⁷.

1. Succinato-SUCNR1 como eje clave en la modulación de procesos inflamatorios

El incremento en los niveles intra y extracelulares de succinato se han visto involucrados en diversos procesos de tipo inflamatorio, tal y como se ha mencionado anteriormente. A nivel citosólico, su aumento se ha relacionado con la estabilización del factor de transcripción HIF-1 α , el aumento de IL-1 β y la producción de ROS, en macrófagos activados por la vía clásica^{149,228}. De forma extracelular a través de SUCNR1, se le ha atribuido un papel en la activación de células dendríticas y en la potenciación de la respuesta inflamatoria de los macrófagos^{137–139,181}, aunque cabe destacar que en el momento de la

elaboración de nuestra hipótesis el número de estudios era reducido. En este contexto, nos planteamos estudiar el papel del eje succinato-SUCNR1 en el macrófago como componente celular clave en la fisiopatología de la inflamación ligada a la obesidad. Para ello, a partir de la tecnología Cre-LoxP generamos el modelo de ratón *knockout* (KO) con delección específica del receptor SUCNR1 en la línea mieloide, de ahora en adelante *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}*. En primer lugar, corroboramos la efectividad de nuestra estrategia analizando la expresión de SUCNR1 en macrófagos de diferentes localizaciones, determinando que la expresión del receptor era prácticamente indetectable en las células procedentes de nuestro modelo, mientras que en el grupo control la expresión en los ATMs era significativamente mayor en relación a los macrófagos de otras localizaciones. Por otro lado, observamos un mayor infiltrado de macrófagos en TA en el ratón KO específico, mientras que no hubo diferencias en cuanto a número de neutrófilos en WAT de ambos genotipos. El estudio de las poblaciones de ATMs por citometría de flujo, nos mostró que existía un porcentaje superior de población de macrófagos con marcadores CD11b⁺CD11c⁺CD206⁻ (proinflamatorios) junto con una disminución de aquellos que eran CD11b⁺CD11c⁻CD206⁺ (antiinflamatorios) en el scWAT de ratones *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* frente al grupo control. Posteriormente, nos centramos en el estudio de las características de nuestro modelo alimentado con dieta estándar, donde no observamos diferencias destacables a nivel de peso corporal. Sorprendentemente, y a pesar de que se había descrito que el succinato era principalmente un molécula estimuladora de la inflamación^{137,149}, encontramos que la delección específica de SUCNR1 inducía un perfil inflamatorio en el WAT y en el hígado, junto con una disrupción en la homeostasia glucídica. Un estudio más exhaustivo de este fenotipo a diferentes tiempos nos permitió determinar, que la inflamación se presentaba como evento previo al desarrollo de la IR.

Bajo una alimentación rica en grasa, como estímulo inductor de obesidad y estrés crónico, observamos que *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* presentaba mayor susceptibilidad al aumento de peso y al desarrollo de un peor perfil metabólico. También detectamos mayor inflamación en WAT e hígado y mayor infiltrado de macrófagos en WAT respecto al control, de forma similar a lo ocurrido con la dieta estándar. En cuanto a los resultados de los estudios metabólicos llevados

a cabo con el KO global existen ciertas contradicciones. Así, McCreath y colaboradores describieron un efecto dicotómico en respuesta a una dieta rica en grasa, donde al inicio parecían estar protegidos pero a largo plazo la ganancia de peso y las consecuencias metabólicas negativas resultaban peores en su modelo respecto al grupo control¹⁹¹. Por su parte, van Diepen y colaboradores reportaron una mayor tolerancia a glucosa en asociación a un menor infiltrado tisular de macrófagos en su modelo expuesto a dieta grasa, a pesar de no detectar diferencias de peso corporal en relación al grupo control¹³⁹. Las discrepancias entre ambos estudios podrían ser debidas a las diferentes intervenciones dietéticas aplicadas, tanto en periodo como en porcentaje de grasa, así como también, al hecho de haber aplicado diferentes estrategias en la generación de los respectivos modelos KO global. En este sentido, cabe destacar la importancia del uso de modelos KO específicos a la hora de evaluar la funcionalidad de receptores y de vías que son tejido específicas.

Para acabar de comprender la respuesta adaptativa de nuestro modelo ante una situación de estrés agudo *in vivo*, y confirmar que la deficiencia de SUCNR1 en macrófagos afecta a la respuesta antiinflamatoria de los mismos, llevamos a cabo un experimento de exposición prolongada a bajas temperaturas, situación que en condiciones fisiológicas estimula el proceso de browning del WAT y en cuyo desarrollo interviene la respuesta inmunitaria tipo 2²²⁹. Los resultados mostraron una reducida expresión de UCP1 y otros componentes implicados en el proceso de termogénesis, junto con escasos cambios morfológicos a nivel de los adipocitos en scWAT de *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* respecto al control. Por otra parte, detectamos una mayor expresión de UCP1 tanto a nivel de RNAm como de proteína en el BAT en relación al control, lo que se ajustaba al hecho de que a pesar de tener una capacidad reducida de browning no detectáramos diferencias en cuanto a gasto energético entre genotipos, denotando la presencia de un posible mecanismo de compensación en respuesta a la precaria capacidad de browning del modelo específico.

Finalmente, comentar unos resultados no publicados de nuestro grupo que permiten corroborar los datos hallados hasta el momento, al evaluar la respuesta de nuestro KO específico frente a un proceso endotoxémico llevado a cabo por inyección intraperitoneal de LPS. Lo que observamos fue que tras 6h de la

inoculación, *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* presentaba una menor expresión de genes proinflamatorios en WAT e hígado, así como también de citoquinas proinflamatorias circulantes. Al evaluar los mismos parámetros al cabo de 72h, vimos que por el contrario, *LysM-Cre Sucnr1^{fl/fl}* presentaba un incremento significativo de dichos parámetros inflamatorios en relación al grupo control. Lo que demuestra que la delección de SUCNR1 en la línea mieloide altera la capacidad de proporcionar una respuesta inflamatoria adecuada ante una condición de daño sistémico severo (datos en consonancia con resultados previamente publicados¹³⁷), a la vez que impide la correcta resolución de la inflamación una vez resuelto el proceso de injuria.

De forma global, los resultados derivados del estudio *in vivo* nos permitieron demostrar el papel fundamental del eje succinato-SUCNR1 en la modulación de los procesos inflamatorios que tienen lugar tanto de forma aguda como crónica, así como también, en el mantenimiento de la homeostasia metabólica y tisular. Estudios recientes, también han aportado evidencia de la implicación de esta vía en el proceso de resolución de la inflamación como es el caso de las células madre neurales en un modelo experimental de encefalomiелitis autoinmune¹⁸⁴, así como en la respuesta inmune de tipo Th2 y en la defensa contra parásitos helmintos en el intestino delgado¹⁸⁹.

Con intención de profundizar en las características de la vía succinato-SUCNR1 en el macrófago, nos centramos en el estudio *in vitro* a través de cultivos primarios y de líneas establecidas. Entre las primeras observaciones, encontramos que tal y como se había descrito, el macrófago de tipo inflamatorio secretaba abundante cantidad de succinato¹³⁸, producto de una elevada producción a nivel intracelular²²⁸. No obstante, advertimos por primera vez que la expresión de SUCNR1 era muy superior en el macrófago antiinflamatorio en relación al fenotipo opuesto, dato que sería confirmado poco tiempo después en macrófagos humanos según otro estudio¹³⁹. En base a estos resultados, analizamos la posible relación entre la expresión de SUCNR1 y la vía de señalización de la IL-4, como inductora del fenotipo antiinflamatorio. Un análisis *in silico* nos mostró que la región promotora de SUCNR1 en BMDMs poseía sitios de unión para STAT6 (del inglés *signal transducer and activator of transcription 6*), un factor de transcripción activado por IL-4²³⁰. A partir de aquí, mediante el

uso de técnicas de siRNA (del inglés *small interfering RNA*) y cultivos primarios de un modelo *Stat6*^{-/-}, confirmamos que la expresión de SUCNR1 era inducida por IL-4 a través de la activación de los factores de transcripción STAT6 Y KLF4 (del inglés *kruppel like factor 4*) ambos involucrados en el programa antiinflamatorio de los macrófagos²³¹.

Con el objetivo de determinar la magnitud del efecto producido por la ausencia de SUCNR1, analizamos las características de los macrófagos obtenidos a partir de diferentes localizaciones. Los resultados nos mostraron que los macrófagos pertenecientes a *LysM-Cre Sucnr1*^{fl/fl} presentaban mayor expresión de genes proinflamatorios en relación a las células del grupo control. Asimismo, tras estimular con IL-4, observamos una respuesta defectuosa con apenas un discreto incremento de genes antiinflamatorios en el grupo *LysM-Cre Sucnr1*^{fl/fl}. De forma interesante, ante la estimulación con succinato comprobamos un notable aumento de marcadores antiinflamatorios en el grupo control, que no tuvo lugar en el deficiente en SUCNR1, datos que nos permiten demostrar que el succinato activa el programa antiinflamatorio por un mecanismo dependiente de SUCNR1.

Como moduladores de los efectos de la IL-4, nos centramos en las vías mediadas por los factores de transcripción KLF4 y CREB (del inglés *cAMP response element-binding*)²³², en base a estudios previos que habían descrito la activación de la vía AMPc (adenosín monofosfato cíclico)-CREB por parte de otros GPCRs²³³. De esta forma, exploramos dichas cascadas como posibles diana de la acción del succinato extracelular en el macrófago. Los resultados obtenidos indicaron que el succinato inducía por sí solo, e incrementaba junto a IL-4 la fosforilación de CREB y de la proteína PKA (del inglés *protein kinase A*) dependiente de AMPc. Procesos que se vieron interrumpidos en presencia de un inhibidor de PKA, un siRNA de KLF4 y en ausencia de SUCNR1, demostrando así que la cascada de señalización de SUCNR1 en el macrófago se encuentra mediada por la secuencia PKA-CREB-KLF4, originando un efecto sumatorio con la vía de la IL-4. De acuerdo con este hallazgo, el succinato extracelular tendría una función semejante a la descrita en el caso de la IL-6^{234,235}, formando parte tanto del proceso inflamatorio agudo¹³⁷ como de su resolución al actuar también en favor del fenotipo antiinflamatorio de los macrófagos (nuestros resultados)²²³.

Discusión

Posteriormente, realizamos un análisis transcriptómico de los ATMs de scWAT y vWAT de nuestro modelo murino frente al grupo control. En el estudio comparativo en el grupo control sobre el perfil de transcripción de ambos tejidos, observamos que de forma congruente con anteriores publicaciones^{118,119} los ATMs de vWAT se caracterizaron por tener un perfil con mayor expresión de vías inflamatorias que aquellos derivados de scWAT, datos que contribuyen a la evidencia acerca de los mecanismos involucrados en el papel beneficioso en la homeostasia tisular atribuida al scWAT⁸¹⁻⁸³. Por otro lado, en cuanto al efecto producido por la delección de SUCNR1 en los ATMs, pudimos comprobar que su fenotipo se vió alterado en ambos depósitos pero de manera diferencial. Así, los ATMs de scWAT deficientes en SUCNR1 presentaron una sobreexpresión de vías inflamatorias, mientras que se observó el efecto contrario en los que provenían de vWAT. Estos datos demuestran la implicación de la señalización succinato-SUCNR1 en el mantenimiento del fenotipo y las características de los macrófagos provenientes de ambos depósitos, y confirman el papel dual de SUCNR1 en la funcionalidad de los macrófagos en lo que respecta al proceso inflamatorio: por un lado como inductor del programa antiinflamatorio en macrófagos residentes de tejido y en condiciones basales, y por otro, como activador de la inflamación en aquellos macrófagos previamente activados, de acuerdo con estudios previos^{138,139,181,228}.

Por último, nos centramos en estudiar el efecto de la obesidad en humanos sobre la vía de señalización del succinato en el WAT. Un estudio de nuestro grupo había demostrado previamente que la obesidad se caracteriza por unos niveles elevados de succinato circulante¹⁶⁶, dato que se confirmó en la cohorte utilizada en este trabajo. En relación a SUCNR1, detectamos una mayor expresión en scWAT y vWAT de individuos obesos respecto a individuos con normopeso, a expensas de un incremento a nivel de sus adipocitos. De forma importante, encontramos una asociación positiva entre la expresión de SUCNR1 en scWAT y ciertos parámetros asociados a un peor perfil metabólico, incluyendo la glucosa circulante, la circunferencia de cadera y la presión arterial diastólica. Sin embargo, la expresión de SUCNR1 junto a la de otros marcadores antiinflamatorios resultó ser menor en la fracción de ATMs de scWAT de estos individuos²²³, siendo mayor la expresión de marcadores inflamatorios tal y como

se había descrito previamente^{109,114}. En cuanto al efecto del succinato en los explantes de scWAT humano, advertimos una reducción en la expresión de marcadores inflamatorios en aquellas muestras que pertenecían a individuos con normopeso, que corroboran el efecto antiinflamatorio del succinato. Mientras que se detectó un efecto contrario en aquellas biopsias procedentes de individuos obesos. Estos datos confirman nuevamente la dualidad de este metabolito en referencia al control de la inflamación, y que como ya se ha mencionado, permiten equipararlo a otras citoquinas como la IL-6^{234,235}.

En conjunto, estos resultados demuestran que la obesidad está asociada a unos niveles elevados de succinato^{166,227} pero a una resistencia a sus efectos antiinflamatorios, debido muy probablemente a la disminución de la expresión de SUCNR1 en los macrófagos que caracterizan dicho estado. Este fenómeno, que guarda similitud al de otras hormonas como la leptina y la insulina²³⁶, sería un componente fundamental no solo durante el desarrollo de la inflamación en la obesidad, sino también en el mantenimiento de su cronicidad. Si bien resta por conocer qué otras implicaciones puede tener este estado de “resistencia al succinato” en el organismo, este estudio revela que la depleción de esta vía provoca una afectación en la respuesta adecuada a procesos inflamatorios tanto de tipo agudo como crónico, así como en el curso natural de su resolución. De igual forma, pone en evidencia la importancia de este eje como factor determinante para el mantenimiento de los macrófagos residentes de tejido, así como de aquellos previamente activados, corroborando nuevamente el papel dual de esta vía de señalización, como se resume en la figura 11.

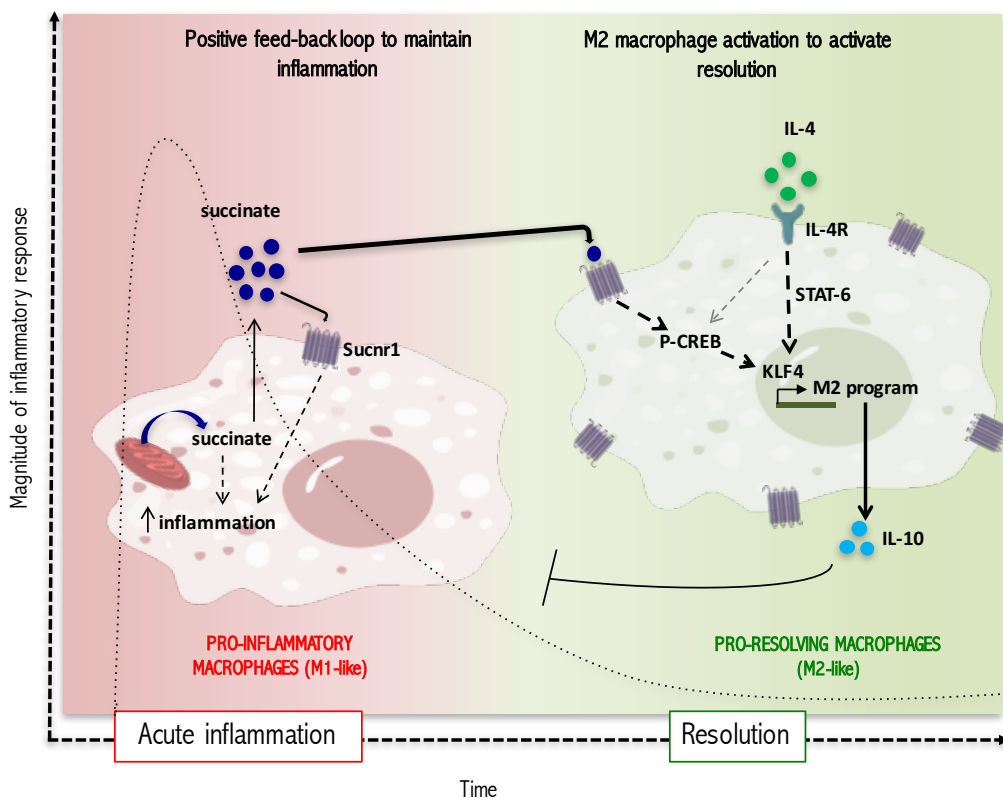


Figura 11. Esquema resumen de los mecanismos involucrados en la señalización del receptor SUCNR1 y sus efectos en el macrófago. El succinato actúa a través de SUCNR1 de forma dual, por un lado potencia la respuesta inflamatoria de los macrófagos activados por la vía clásica; y por otro, participa en el proceso de resolución de la inflamación ulterior, a través de la activación de la vía PKA-CREB-KLF4, de forma sinérgica a la vía de la IL-4.

2. Succinato circulante como biomarcador del estado metabólico

Son varios los estudios que han relacionado niveles elevados de succinato con condiciones que constituyen un factor de riesgo en el desarrollo de la enfermedad CV, como la HTA^{165,237}, la enfermedad cardíaca isquémica¹⁴⁶ y la T2D^{139,165,186}. De acuerdo con esto, nuestro grupo demostró recientemente que los niveles de succinato se asocian de forma positiva con el BMI, así como con cambios en la composición de la microbiota intestinal¹⁶⁶. Este mismo estudio, también estableció una asociación positiva entre los niveles de succinato y la glicemia, la insulinemia y los TG circulantes, datos que también pudimos corroborar con el presente trabajo. El succinato además, representa un valioso

papel como marcador del estado metabólico de la célula, gracias a su posición clave dentro de su metabolismo, formando parte del TCA y de la cadena de transporte de electrones. Es por ello, que con el objetivo de determinar si los niveles circulantes de succinato podrían funcionar como un biomarcador temprano de la disfunción metabólica, nos propusimos estudiarlos en el contexto de pacientes obesos y diabéticos candidatos a cirugía bariátrica. En este sentido, el succinato también se ha relacionado con el metabolismo del BAT^{204,238}, y su producción por parte de la microbiota con una mejora en el metabolismo glucídico a nivel intestinal^{208,239}, ambos procesos descritos como parte de los mecanismos que median los efectos beneficiosos de la cirugía bariátrica a nivel metabólico^{240,241}. En base a toda esta evidencia, en esta parte de la presente tesis doctoral nos hemos centrado en la posible implicación del succinato en la respuesta clínica derivada de la cirugía metabólica.

Es bien sabido que la cirugía bariátrica fue diseñada en sus inicios con el objetivo de promover la pérdida de peso. Sin embargo, resulta innegable su papel en el tratamiento de las comorbilidades asociadas a la obesidad^{46,242}, y en especial de la T2D²⁴², motivo por el que en la actualidad se hace referencia a ella en términos de cirugía metabólica. Entre las técnicas más populares se encuentra la SG y el RYGB, que según la evidencia actual no parecen presentar diferencias significativas en cuanto a beneficio en el tratamiento de la T2D a largo plazo⁵². En este estudio nos planteamos estudiar la utilidad de los niveles circulantes de succinato como indicador de la respuesta metabólica en pacientes sometidos a diferentes tipos de cirugía bariátrica. Para ello, empleamos una primera cohorte en la que pacientes obesos con T2D fueron asignados de forma aleatoria a uno de los siguientes tipos de cirugía bariátrica RYGB, SG o LGCP. Los niveles de succinato se determinaron previa cirugía y al cabo de 1 y 2 años de la intervención. En esta primera cohorte, tras un año de la cirugía observamos una mejora en relación a medidas antropométricas y parámetros relacionados con el perfil glicémico y lipídico, donde todos los participantes presentaron reducción del peso corporal, el BMI, la circunferencia de cintura y el ratio cintura-cadera, así como una reducción en los niveles de glucosa, insulina, HbA1c y colesterol circulantes. De forma destacable, los grupos con un mejor perfil glicémico fueron los sometidos a RYGB y a SG, mientras que la máxima

reducción de peso corporal y de BMI se observó en el grupo de RYGB, de forma congruente con lo descrito en la literatura⁵².

En cuanto a los niveles circulantes de succinato basal, en los 3 grupos encontramos una correlación positiva con la glicemia, la HbA1c y los TG, que corroboraban resultados previos de un estudio publicado por nuestro grupo¹⁶⁶. Al cabo de un año de la cirugía, los niveles de succinato sérico se habían reducido de forma significativa en todos los participantes del estudio, aunque tras analizarse según tipo de cirugía resultaba significativo únicamente en el grupo de RYGB. Esta disminución en los niveles de succinato se asoció a una reducción del peso corporal y a una mejora de parámetros metabólicos, como se pudo corroborar posteriormente en otro estudio llevado a cabo por nuestro grupo¹⁹⁵, en el que se detectó además un patrón diferencial en los niveles de succinato en respuesta a la estimulación nutricional. De forma interesante, esta respuesta nutricional parece estar directamente relacionada con el estado metabólico del paciente ya que se recupera al cabo de un año de la cirugía bariátrica¹⁹⁵. Este comportamiento es muy similar a lo que ocurre con otras hormonas reguladoras de la homeostasia glicémica como son la insulina y las incretinas como el GLP-1²⁴³⁻²⁴⁵, pudiendo establecerse una analogía en cuanto al papel del succinato en la regulación del metabolismo de la glucosa.

Entre los factores que pudimos relacionar con la remisión de T2D encontramos una fuerte asociación con los niveles basales de succinato, así como también con otras variables previamente estudiadas como el tipo de cirugía, el tratamiento previo con insulina y los niveles basales de HbA1c^{246,247}. En cuanto al tipo de cirugía, un metanálisis reciente indica que esta por sí sola no es capaz de predecir el ratio de remisión de T2D. Sin embargo, considerar múltiples factores durante el proceso de selección del procedimiento adecuado a cada paciente, puede mejorar notablemente la capacidad predictiva²⁴⁷. En ese sentido, se han propuesto otros factores como la edad, el tiempo de evolución de la enfermedad, la cantidad de peso perdido y los niveles basales de péptido C^{244,246,248-250}, algunos de los cuales se han combinado para obtener modelos estadísticos predictivos de la remisión de T2D tras cirugía²⁵¹⁻²⁵⁴. Aún así, dichos modelos carecen de precisión ya que en ocasiones eluden parámetros importantes que se cree que en conjunto podrían ser determinantes en los ratios

de remisión, como sería el tipo de cirugía²⁴⁷, y que permitirían explicar porqué algunos pacientes responden mejor que otros a determinados procedimientos^{255–257}. De hecho, en la actualidad la RYGB continúa siendo la técnica de elección para aquellos pacientes con enfermedad de larga duración y peor perfil metabólico, probablemente por la mayor pérdida de peso conseguida⁵² y el mayor ratio de remisión de T2D durante el primer año²⁵⁸, aunque con mayor tasa de complicaciones en relación a la SG²⁵⁹. Sin embargo, resulta indispensable disponer de nuevas herramientas que permitan identificar de forma eficaz pacientes susceptibles de beneficiarse de un tipo u otro de cirugía, aproximándonos cada vez más al objetivo de la medicina del futuro, que es el de una medicina personalizada.

Nuestro estudio demostró claramente una asociación negativa entre los niveles de succinato basales (antes de cirugía) y la remisión de T2D, de forma que aquellos con menores niveles de succinato presentaron mayor tasa de remisión. Para valorar la utilidad de este metabolito como predictor, se realizó un análisis de sensibilidad y especificidad en relación a la capacidad discriminativa remisión-no remisión de T2D, a partir del cual se obtuvo un punto de corte con el que poder clasificar a los pacientes en base a unos niveles de succinato “altos” o “bajos”. De forma interesante, la capacidad predictiva del succinato basal (empleado de forma aislada) igualó a la de otros modelos conformados por diferentes variables diseñados con idéntica finalidad^{251–254}. Por otra parte, encontramos que los niveles basales de succinato y el tipo de cirugía se relacionaron de forma independiente con el ratio de remisión de T2D, por lo que a partir de ambas variables elaboramos un nuevo modelo de predicción denominado DiaSuc. El valor predictivo de este modelo, resultó ser significativamente superior a los modelos establecidos ABCD y AdDiaRem, y ligeramente superior, aunque no de forma significativa, a los modelos DiaRem y DiaBetter²²⁷.

Los resultados obtenidos con el modelo DiaSuc, se verificaron con otro análisis basado en un árbol de decisión. En el primer nodo se reveló como factor predictor de mayor impacto en la tasa de remisión de T2D los niveles de succinato precirugía, mientras que en el segundo nodo fue el tipo de cirugía según si se trataba de restrictiva (SG) o malabsortiva (RYGB). En relación al

primer nodo, el análisis mostró que los pacientes que partían de niveles de succinato precirugía inferiores al punto de corte establecido presentaban mayor tasa de remisión al año que aquellos que estaban por encima. Respecto al segundo nodo, concluimos que los pacientes con niveles bajos de succinato mostraron ratios de remisión semejante independientemente del tipo de cirugía practicada, mientras que aquellos que partían de niveles elevados presentaban mayor tasa de remisión si se les había aplicado la cirugía malabsortiva.

Para determinar el alcance del succinato como predictor de remisión de T2D, extendimos el seguimiento a 2 años tras cirugía. Si bien la tasa de remisión había disminuido ligeramente respecto al primer año, los pacientes que continuaban presentando remisión de T2D eran aquellos con menor concentración de succinato basal. Respecto al valor predictivo del modelo DiaSuc al cabo de dos años, este continuó siendo superior en relación a los demás modelos de predicción de T2D²²⁷, mejorando de forma significativa a los modelos ABCD, DiaBetter y DiaRem. Finalmente, validamos nuestros resultados en una segunda cohorte independiente donde observamos que se corroboraba tanto la disminución de los niveles de succinato al año de la cirugía bariátrica, como la notable capacidad predictiva del modelo DiaSuc en la remisión de T2D. Todo ello evidencia el potencial del succinato como una herramienta valiosa en la predicción de remisión de T2D tras cirugía bariátrica, aplicable no solo al proceso de selección de pacientes susceptibles de beneficiarse de este tipo de intervención, sino que también, como criterio de selección del tipo de cirugía adecuada a cada paciente.

En resumen, nuestros estudios revelan la implicación de la vía succinato-SUCNR1 en la respuesta a procesos inflamatorios del organismo, así como en los mecanismos involucrados en su resolución. Además, ponen de manifiesto el enorme potencial de esta ruta desde un punto de vista traslacional en el contexto de enfermedades metabólicas. Así, la vía succinato-SUCNR1 emerge como potencial diana terapéutica en el manejo de enfermedades como la obesidad y la diabetes, tanto a nivel de desarrollo de moléculas dirigidas a la modulación del receptor y sus funciones específicas, como desde el punto de vista del empleo de los niveles de succinato como biomarcador del estado metabólico, aplicable en el manejo y pronóstico de dichas patologías.

Discusión

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La expresión del receptor SUCNR1 es inducida por la vía de señalización de la IL-4 como parte del programa antiinflamatorio de los macrófagos.
2. La cascada de señalización de SUCNR1 en el macrófago es mediada por la secuencia PKA-CREB-KLF4, que induce un fenotipo antiinflamatorio de forma sinérgica con la vía de la IL-4.
3. El eje succinato-SUCNR1 tiene un papel crucial en el mantenimiento del fenotipo y funcionalidad de los macrófagos. De forma que la depleción de esta vía interfiere en la adecuada respuesta frente a procesos inflamatorios de tipo agudo y crónico, así como también en el curso natural de su resolución.
4. La ausencia de SUCNR1 en los macrófagos provoca un estado de inflamación tisular que tiene un impacto directo sobre la homeostasia glucídica.
5. La obesidad se caracteriza por un incremento de los niveles circulantes de succinato, así como por una depleción en la expresión de SUCNR1 en el macrófago, eventos que conducen a un estado de resistencia a la acción antiinflamatorio del succinato.
6. Los niveles circulantes de succinato son buenos indicadores del estado metabólico del individuo, correlacionándose de forma positiva con la glicemia, la HbA1c, los niveles de insulina y de TG circulantes.
7. La disminución de los niveles de succinato circulante tras un año de cirugía metabólica resulta especialmente significativa en el grupo sometido a RYGB.

Conclusiones

8. Niveles bajos de succinato basal circulante parecen relacionarse con tasas equivalentes de remisión de T2D, independientemente del tipo de intervención aplicada. Por el contrario, niveles elevados de succinato se asocian con mayor tasa de remisión al combinarse concretamente con la cirugía RYGB.
9. Los niveles de succinato precirugía actúan como buenos predictores de remisión de T2D tras cirugía, igualando la capacidad de otros modelos más complejos diseñados con idéntica finalidad.
10. El modelo DiaSuc, que incluye los niveles de succinato basales del paciente junto con el tipo de cirugía, presenta una capacidad predictiva de remisión de T2D superior a muchos de los modelos establecidos previamente en la literatura.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Mendis, S., Davis, S. & Norrving, B. Organizational Update. *Stroke* **46**, e123 (2015).
2. Hinnouho, G. M. *et al.* Metabolically healthy obesity and risk of mortality: Does the definition of metabolic health matter? *Diabetes Care* **36**, 2294–2300 (2013).
3. Sattler, A. R. & Olefsky, J. M. Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease. *J. Clin. Invest.* **127**, 1–4 (2017).
4. Rubio Herrera, M. A. & Bretón Lesmes, I. Obesity in the COVID era: A global health challenge. *Endocrinol. Diabetes y Nutr.* **68**, 123–129 (2021).
5. World Health Organization. Obesity and overweight. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (2020).
6. Seidell, J. C. Epidemiology - Definition and Classification of Obesity. *Clin. Obes. Adults Child.* **23**, 1–11 (2007).
7. Iwao, S. *et al.* Does waist circumference add to the predictive power of the body mass index for coronary risk? *Obes. Res.* **9**, 685–695 (2001).
8. Arden, C. I., Katzmarzyk, P. T., Janssen, I. & Ross, R. Discrimination of health risk by combined body mass index and waist circumference. *Obes. Res.* **11**, 135–142 (2003).
9. Han, T. S., Van Leer, E. M., Seidell, J. C. & Lean, M. E. J. Waist circumference action levels in the identification of cardiovascular risk factors: Prevalence study in a random sample. *Bmj* **311**, 1401 (1995).
10. Cao, Q. *et al.* Waist-hip ratio as a predictor of myocardial infarction risk A systematic review and meta-analysis. *Med. (United States)* **97**, (2018).
11. Clément, K. *et al.* A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* **392**, 398–401 (1998).
12. Farooqi, I. S. *et al.* Dominant and recessive inheritance of morbid obesity associate with melanocortin 4 receptor deficiency. *J. Clin. Invest.* **106**, 271–279 (2000).

13. Krude, H. *et al.* Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat. Genet.* **19**, 155–157 (1998).
14. Panzeri, I. & Pospisilik, J. A. Epigenetic control of variation and stochasticity in metabolic disease. *Mol. Metab.* **14**, 26–38 (2018).
15. Singh, R. K., Kumar, P. & Mahalingam, K. Molecular genetics of human obesity: A comprehensive review. *Comptes Rendus - Biol.* **340**, 87–108 (2017).
16. Virtue, S. & Vidal-Puig, A. Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome - An allostatic perspective. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1801**, 338–349 (2010).
17. Wilding, J. P. H. The importance of free fatty acids in the development of Type 2 diabetes. *Diabet. Med.* **24**, 934–945 (2007).
18. Cox, A. R., Chernis, N., Masschelin, P. M. & Hartig, S. M. Immune Cells Gate White Adipose Tissue Expansion. *Endocrinology* **160**, 1645–1658 (2019).
19. Smyth, S. & Heron, A. Diabetes and obesity: The twin epidemics. *Nat. Med.* **12**, 75–80 (2006).
20. Wenshan, W. & Patrick, S. Impact Cardiovascular Biology. *Diabetes* **53**, 2735–2740 (2004).
21. Maedler, K. *et al.* Glucose Induces β -Cell Apoptosis Via Upregulation of the Fas Receptor in Human Islets. *Diabetes* **50**, 1683–1690 (2001).
22. Taylor, R. Type 2 diabetes: Etiology and reversibility. *Diabetes Care* **36**, 1047–1055 (2013).
23. Eckel, R. H., Grundy, S. M. & Zimmet, P. Z. The metabolic syndrome. *Lancet* **365**, 16–22 (2005).
24. Kalupahana, N. S., Moustaid-Moussa, N. & Claycombe, K. J. Immunity as a link between obesity and insulin resistance. *Mol. Aspects Med.* **33**, 26–34 (2012).
25. Lorenzo, M. *et al.* Insulin resistance induced by tumor necrosis factor- α in myocytes and brown adipocytes. *J. Anim. Sci.* **86**, 94–104 (2008).
26. Ye, J. Regulation of PPAR γ function by TNF- α . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **374**, 405–408 (2008).

27. Ye, J. & Gimble, J. M. Regulation of stem cell differentiation in adipose tissue by chronic inflammation. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **38**, 872–878 (2011).
28. Könner, A. C. & Brüning, J. C. Toll-like receptors: Linking inflammation to metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* **22**, 16–23 (2011).
29. Corio, R. *et al.* Estrategia SEMERGEN, SEEDO y SEEN para la prevención y el tratamiento del sobrepeso y la obesidad en Atención Primaria. *Semergen* **33**, 463–465 (2007).
30. Kushner, R. F. Weight Loss Strategies for Treatment of Obesity: Lifestyle Management and Pharmacotherapy. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **61**, 246–252 (2018).
31. Navarro-Falcón, M. & Jáuregui-Lobera, I. Tratamiento farmacológico de la obesidad. *JONNPR* **5**, 1464–69 (2020).
32. Sjostrom, L. *et al.* Randomised placebo-controlled trial of orlistat for weight loss and prevention of weight regain in obese patients. *Ter. Arkh.* **72**, 50–54 (2000).
33. Torgerson, J. S., Hauptman, J., Boldrin, M. & Sjostrom, L. Xenical in the prevention of diabetes in obese subjects (XENDOS) study. *Diabetes Care* **27**, 155–61 (2004).
34. Rucker, D., Padwal, R., Li, S. K., Curioni, C. & Lau, D. C. W. Long term pharmacotherapy for obesity and overweight: Updated meta-analysis. *Br. Med. J.* **335**, 1194–1199 (2007).
35. Astrup, A. *et al.* Safety, tolerability and sustained weight loss over 2 years with the once-daily human GLP-1 analog, liraglutide. *Int. J. Obes.* **36**, 843–854 (2012).
36. Le Roux, C. W. *et al.* 3 Years of Liraglutide Versus Placebo for Type 2 Diabetes Risk Reduction and Weight Management in Individuals With Prediabetes: a Randomised, Double-Blind Trial. *Lancet* **389**, 1399–1409 (2017).
37. Greenway, F. L. *et al.* Effect of naltrexone plus bupropion on weight loss in overweight and obese adults (COR-1): A multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* **376**, 595–605 (2010).
38. Apovian, C. M. *et al.* A randomized, phase 3 trial of naltrexone

- SR/bupropion SR on weight and obesity-related risk factors (COR-II). *Obesity* **21**, 935–943 (2013).
39. Wadden, T. A. *et al.* Weight loss with naltrexone SR/bupropion SR combination therapy as an adjunct to behavior modification: The COR-BMOD trial. *Obesity* **19**, 110–120 (2011).
40. Ganguly, R. *et al.* Persistence of newer anti-obesity medications in a real-world setting. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **143**, 348–356 (2018).
41. Rubio herrera, M. A., Fernández García, J. M., Corio Andújar, R., Santos Altozano, C. & Urieta Carpi, J. J. Tratamiento farmacológico de la obesidad para médicos de Atención Primaria. *SEMERGEN* **45**, 559–565 (2019).
42. Fried, M. *et al.* Interdisciplinary European guidelines on metabolic and bariatric surgery. *Obes. Surg.* **24**, 42–55 (2014).
43. Gregg, E. W. *et al.* Association of an Intensive Lifestyle Intervention With Remission of Type 2 Diabetes. *Physiol. Behav.* **176**, 139–148 (2016).
44. Khorgami, Z. *et al.* Outcomes of Bariatric Surgery Versus Medical Management for Type 2 Diabetes Mellitus: a Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Obes. Surg.* **29**, 964–974 (2019).
45. Fakhry, T. K. *et al.* Bariatric surgery improves nonalcoholic fatty liver disease: a contemporary systematic review and meta-analysis. *Surg. Obes. Relat. Dis.* **15**, 502–511 (2019).
46. Wiggins, T., Guidozi, N., Welbourn, R., Ahmed, A. R. & Markar, S. R. Association of bariatric surgery with all-cause mortality and incidence of obesity-related disease at a population level: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Med.* **17**, 1–18 (2020).
47. Buchwald, H. The evolution of metabolic/bariatric surgery. *Obes. Surg.* **24**, 1126–1135 (2014).
48. Wolfe, B. M., Kvach, E. & Eckel, R. H. Treatment of obesity. *Circ. Res.* **118**, 1844–1855 (2016).
49. Haluzík, M., Kratochvílová, H., Haluzíková, D. & Mráz, M. Gut as an emerging organ for the treatment of diabetes: Focus on mechanism of action of bariatric and endoscopic interventions. *J. Endocrinol.* **237**, R1–R17 (2018).
50. Hanipah ZN, S. P. Bariatric Surgery as a Long-Term Treatment for Type 2

- Diabetes/Metabolic Syndrome. *Annu Rev Med* **71**, 1–15 (2020).
51. Park, C. H. *et al.* Comparative efficacy of bariatric endoscopic procedures in the treatment of morbid obesity: A systematic review and network meta-analysis. *Endoscopy* **52**, 940–954 (2020).
 52. Lee, Y. *et al.* Laparoscopic Sleeve Gastrectomy Versus Laparoscopic Roux-en-Y Gastric Bypass: A Systematic Review and Meta-analysis of Weight Loss, Comorbidities, and Biochemical Outcomes From Randomized Controlled Trials. *Ann. Surg.* **273**, 66–74 (2021).
 53. Ashrafian, H. & le Roux, C. W. Metabolic surgery and gut hormones - A review of bariatric entero-humoral modulation. *Physiol. Behav.* **97**, 620–631 (2009).
 54. Jackness, C. *et al.* Very lowcalorie diet mimics the early beneficial effect of rouxen-Y gastric bypass on insulin sensitivity and β -cell function in type 2 diabetic patients. *Diabetes* **62**, 3027–3032 (2013).
 55. Rubino, F. *et al.* Metabolic surgery in the treatment algorithm for type 2 diabetes: A joint statement by international diabetes organizations. *Diabetes Care* **39**, 861–877 (2016).
 56. Dang, J. T. *et al.* Predictive factors for diabetes remission after bariatric surgery. *Can. J. Surg.* **62**, 315–319 (2019).
 57. Cinti, S. The adipose organ. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* **73**, 9–15 (2005).
 58. Giralt, M. & Villarroya, F. White, brown, beige/brite: Different adipose cells for different functions? *Endocrinology* **154**, 2992–3000 (2013).
 59. Wenshan, W. & Patrick, S. Control of brown and beige fat development. *Nat Rev Mol Cell Biol* **17**, 691–702 (2016).
 60. Saito, M. Brown adipose tissue as a regulator of body fat in humans. 1–48 (2012) doi:10.4093/dmj.2013.37.1.22.
 61. Morrison, S. F., Madden, C. J. & Tupone, D. Central neural regulation of brown adipose tissue thermogenesis and energy expenditure. *Cell Metab.* **19**, 741–756 (2014).
 62. Mullur, R., Liu, Y. Y. & Brent, G. A. Thyroid hormone regulation of metabolism. *Physiol. Rev.* **94**, 355–382 (2014).
 63. Rothwell, N. J. & Stock, M. J. A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Nature* **281**, 31–35 (1979).

64. Beck, V. *et al.* Polyunsaturated fatty acids activate human uncoupling proteins 1 and 2 in planar lipid bilayers. *FASEB J.* **21**, 1137–1144 (2007).
65. Okla, M., Kim, J., Koehler, K. & Chungn, S. Dietary factors promoting brown and beige fat development and thermogenesis. *Adv. Nutr.* **8**, 473–483 (2017).
66. Wu, J. *et al.* Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* **150**, 366–76 (2012).
67. Kahn, C. R., Wang, G. & Lee, K. Y. Altered adipose tissue and adipocyte function in the pathogenesis of metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* **129**, 3990–4000 (2019).
68. Zwick, R. K., Guerrero-Juarez, C. F., Horsley, V. & Plikus, M. V. Anatomical, Physiological, and Functional Diversity of Adipose Tissue. *Cell Metab.* **27**, 68–83 (2018).
69. Spalding, K. L. *et al.* Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* **453**, 783–787 (2008).
70. Gustafson, B., Hammarstedt, A., Hedjazifar, S. & Smith, U. Restricted adipogenesis in hypertrophic obesity: The role of WISP2, WNT, and BMP4. *Diabetes* **62**, 2997–3004 (2013).
71. Hammarstedt, A. *et al.* WISP2 regulates preadipocyte commitment and PPAR γ activation by BMP4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 2563–2568 (2013).
72. Gustafson, B., Hedjazifar, S., Gogg, S., Hammarstedt, A. & Smith, U. Insulin resistance and impaired adipogenesis. *Trends Endocrinol. Metab.* **26**, 193–200 (2015).
73. Lundgren, M. *et al.* Fat cell enlargement is an independent marker of insulin resistance and ‘hyperleptinaemia’. *Diabetologia* **50**, 625–633 (2007).
74. Lee, Y. S. *et al.* Increased Adipocyte O₂ Consumption Triggers HIF-1 α Causing Inflammation and Insulin Resistance in Obesity. *Cell* **157**, 1339–1352 (2014).
75. Arner, P., Arner, E., Hammarstedt, A. & Smith, U. Genetic predisposition for type 2 diabetes, but not for overweight/obesity, is associated with a restricted adipogenesis. *PLoS One* **6**, 2–6 (2011).
76. Shao, M. *et al.* De novo adipocyte differentiation from Pdgfr β ⁺

- preadipocytes protects against pathologic visceral adipose expansion in obesity. *Nat. Commun.* **9**, 1–16 (2018).
77. Blüher, M. Metabolically healthy obesity. *Endocr. Rev.* **41**, 405–420 (2020).
78. Wajchenberg, B. L., Lé, B. & Wajchenberg, O. Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue : *Endocr. Rev.* **21**, 697–738 (2000).
79. Wang, Y., Rimm, E. B., Stampfer, M. J., Willett, W. C. & Hu, F. B. Comparison of abdominal adiposity and overall obesity in predicting risk of type 2 diabetes among men. *Am. J. Clin. Nutr.* **81**, 555–563 (2005).
80. Pischon, T. *et al.* General and Abdominal Adiposity and Risk of Death in Europe. *N. Engl. J. Med.* **359**, 2105–20 (2008).
81. McLaughlin, T., Lamendola, C., Liu, A. & Abbasi, F. Preferential fat deposition in subcutaneous versus visceral depots is associated with insulin sensitivity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **96**, 1756–1760 (2011).
82. Tran, T. T., Yamamoto, Y., Gesta, S. & Kahn, C. R. Beneficial Effects of Subcutaneous Fat Transplantation on Metabolism. *Cell Metab.* **7**, 410–420 (2008).
83. Hocking, S. L. *et al.* Subcutaneous fat transplantation alleviates diet-induced glucose intolerance and inflammation in mice. *Diabetologia* **58**, 1587–1600 (2015).
84. Barzilai, N. *et al.* Surgical removal of visceral fat reverses hepatic insulin resistance. *Diabetes* **48**, 94–98 (1999).
85. Lottati, M., Kolka, C. M., Stefanovski, D., Kirkman, E. L. & Bergman, R. N. Greater omentectomy improves insulin sensitivity in non-obese dogs. *Obesity* **17**, 674–680 (2009).
86. Macotela, Y. *et al.* Intrinsic differences in adipocyte precursor cells from different white fat depots. *Diabetes* **61**, 1691–1699 (2012).
87. Sanchez-Gurmaches, J. *et al.* PTEN loss in the Myf5 lineage redistributes body fat and reveals subsets of white adipocytes that arise from Myf5 precursors. *Cell Metab.* **16**, 348–362 (2012).
88. Tran, K. Van *et al.* The vascular endothelium of the adipose tissue gives rise to both white and brown fat cells. *Cell Metab.* **15**, 222–229 (2012).
89. Rosen, E. D. & Spiegelman, B. M. What we talk about when we talk about fat. *Cell* **156**, 20–44 (2014).

90. Fuster, J. J., Ouchi, N., Gokce, N. & Walsh, K. Obesity-induced changes in adipose tissue microenvironment and their impact on cardiovascular disease. *Circ. Res.* **118**, 1786–1807 (2016).
91. Ahima, R. S. & Lazar, M. A. Adipokines and the peripheral and neural control of energy balance. *Mol. Endocrinol.* **22**, 1023–1031 (2008).
92. Münzberg, H. & Morrison, C. D. Structure, production and signaling of leptin Heike. *Metabolism* **64**, 13–23 (2015).
93. Ahima, R. S. *et al.* Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* **382**, 250–252 (1996).
94. Flier, J. S. & Maratos-Flier, E. Leptin's Physiologic Role: Does the Emperor of Energy Balance Have No Clothes? *Cell Metab.* **26**, 24–26 (2017).
95. Turer, A. T. & Scherer, P. E. Adiponectin: Mechanistic insights and clinical implications. *Diabetologia* vol. 55 2319–2326 (2012).
96. Park, H. K., Kwak, M. K., Kim, H. J. & Ahima, R. S. Linking resistin, inflammation, and cardiometabolic diseases. *Korean J. Intern. Med.* **32**, 239–247 (2017).
97. Lee, S.-A., Yuen, J. J., Jiang, H., Kahn, B. B. & Blaner, W. S. Adipocyte-specific overexpression of retinol-binding protein 4 causes hepatic steatosis in mice. *Hepatology* **64**, 1534–1546 (2016).
98. Fasshauer, M. & Blüher, M. Adipokines in health and disease. *Trends Pharmacol. Sci.* **36**, 461–470 (2015).
99. Kane, H. & Lynch, L. Innate Immune Control of Adipose Tissue Homeostasis. *Trends Immunol.* **40**, 857–872 (2019).
100. Halberg, N. *et al.* Hypoxia-Inducible Factor 1 α Induces Fibrosis and Insulin Resistance in White Adipose Tissue. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 4467–4483 (2009).
101. Davies, L. C., Jenkins, S. J., Allen, J. E. & Taylor, P. R. Tissue-resident macrophages. *Nat. Immunol.* **14**, 986–995 (2013).
102. Gordon, S. & Taylor, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 953–964 (2005).
103. Oh, D. Y., Morinaga, H., Talukdar, S., Bae, E. J. & Olefsky, J. M. Increased macrophage migration into adipose tissue in obese mice. *Diabetes* **61**, 346–354 (2012).

104. Jenkins, S. J. *et al.* Local Macrophage Proliferation, Rather than Recruitment from the Blood, Is a Signature of TH2 Inflammation. *Science* (80-.). **332**, 1284–8 (2011).
105. Hashimoto, D. *et al.* Tissue resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes Daigo. *J.Immuni* **38**, 1–25 (2014).
106. Robbins, C. S. *et al.* Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis. *Nat. Med.* **19**, 1166–1172 (2013).
107. Weisberg, S. P. *et al.* Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* **112**, 1796–1808 (2003).
108. Attie, A. D. & Scherer, P. E. Adipocyte metabolism and obesity. *J. Lipid Res.* **50**, 395–399 (2009).
109. Lumeng, C. N., DeYoung, S. M., Bodzin, J. L. & Saltiel, A. R. Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes* **56**, 16–23 (2007).
110. Strissel, K. J. *et al.* Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes* **56**, 2910–2918 (2007).
111. Nishimura, S. *et al.* Adipogenesis in obesity requires close interplay between differentiating adipocytes, stromal cells, and blood vessels. *Diabetes* **56**, 1517–1526 (2007).
112. Haka, A. S. *et al.* Exocytosis of macrophage lysosomes leads to digestion of apoptotic adipocytes and foam cell formation. *J. Lipid Res.* **57**, 980–992 (2016).
113. Gual, P., Le Marchand-Brustel, Y. & Tanti, J. F. Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie* **87**, 99–109 (2005).
114. Lumeng, C. N., Bodzin, J. L. & Saltiel, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J. Clin. Invest.* **117**, 175–184 (2007).
115. Sica, A. & Mantovani, A. Macrophage plasticity and polarization: In vivo veritas. *J. Clin. Invest.* **122**, 787–795 (2012).
116. Murray, P. J., Allen, J. E., Fisher, E. A. & Lawrence, T. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity.* **41**, 14–20 (2015).

117. Bourlier, V. *et al.* Remodeling phenotype of human subcutaneous adipose tissue macrophages. *Circulation* **117**, 806–815 (2008).
118. Kralova Lesna, I. *et al.* Characterisation and comparison of adipose tissue macrophages from human subcutaneous, visceral and perivascular adipose tissue. *J. Transl. Med.* **14**, 1–9 (2016).
119. Altintas, M. M. *et al.* Mast cells, macrophages, and crown-like structures distinguish subcutaneous from visceral fat in mice. *J. Lipid Res.* **52**, 480–488 (2011).
120. Lee, K. Y. M1 and M2 polarization of macrophages: a mini-review. *Med. Biol. Sci. Eng.* **2**, 1–5 (2019).
121. Fleetwood, A. J., Lawrence, T., Hamilton, J. A. & Cook, A. D. Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (CSF) and Macrophage CSF-Dependent Macrophage Phenotypes Display Differences in Cytokine Profiles and Transcription Factor Activities: Implications for CSF Blockade in Inflammation. *J. Immunol.* **178**, 5245–5252 (2007).
122. O’Neill, L. A. J., Kishton, R. J. & Rathmell, J. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 553–565 (2016).
123. Puleston, D. J., Villa, M. & Pearce, E. L. Ancillary Activity: Beyond Core Metabolism in Immune Cells. *Cell Metab.* **26**, 131–141 (2017).
124. Corcoran, S. E. & O’Neill, L. A. J. HIF1 α and metabolic reprogramming in inflammation. *J. Clin. Invest.* **126**, 3699–3707 (2016).
125. Jha, A. K. *et al.* Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization. *Immunity* **42**, 419–430 (2015).
126. Michelucci, A. *et al.* Immune-responsive gene 1 protein links metabolism to immunity by catalyzing itaconic acid production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 7820–7825 (2013).
127. Mills, E. L. *et al.* Repurposing mitochondria from ATP production to ROS generation drives a pro-inflammatory phenotype in macrophages that depends on succinate oxidation by complex II. *Cell* **167**, 457–470.e13 (2016).
128. McGettrick, A. F. & O’Neill, L. A. J. How metabolism generates signals

- during innate immunity and inflammation. *J. Biol. Chem.* **288**, 22893–22898 (2013).
129. Mills, E. & O'Neill, L. A. J. Succinate: A metabolic signal in inflammation. *Trends Cell Biol.* **24**, 313–320 (2014).
130. Krebs, H. & Johnson, W. The Role of Citric Acid in Intermediate Metabolism in Animal Tissues. in *FEBS Letters* vol. 117 1–10 (Harvard University Press, 1980).
131. Rutter, J., Winge, D. R. & Schiffman, J. D. Succinate dehydrogenase - Assembly, regulation and role in human disease. *Mitochondrion* **10**, 393–401 (2010).
132. de Vadder, F. & Mithieux, G. Gut-brain signaling in energy homeostasis: The unexpected role of microbiota-derived succinate. *J. Endocrinol.* **236**, R105–R108 (2018).
133. Fernández-Veledo, S. & Vendrell, J. Gut microbiota-derived succinate: Friend or foe in human metabolic diseases? *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **20**, 439–447 (2019).
134. Louis, P. & Flint, H. J. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environ. Microbiol.* **19**, 29–41 (2017).
135. Murphy, M. P. & O'Neill, L. A. J. Krebs Cycle Reimagined: The Emerging Roles of Succinate and Itaconate as Signal Transducers. *Cell* **174**, 780–784 (2018).
136. Ariza, A. C., Deen, P. M. T. & Robben, J. H. The succinate receptor as a novel therapeutic target for oxidative and metabolic stress-related conditions. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **3**, 1–8 (2012).
137. Rubic, T. *et al.* Triggering the succinate receptor GPR91 on dendritic cells enhances immunity. *Nat. Immunol.* **9**, 1261–1269 (2008).
138. Littlewood-Evans, A. *et al.* GPR91 senses extracellular succinate released from inflammatory macrophages and exacerbates rheumatoid arthritis. *J. Exp. Med.* **213**, 1655–1662 (2016).
139. van Diepen, J. A. *et al.* SUCNR1-mediated chemotaxis of macrophages aggravates obesity-induced inflammation and diabetes. *Diabetologia* **60**, 1304–1313 (2017).
140. Islam, M. T. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurol. Res.* **39**, 73–82 (2017).

141. Baez-Duarte, B. G., Zamora-Ginez, I., Pérez-Fuentes, R. & Torres-Rasgado, E. Síndrome metabólico y su relación con estrés oxidativo. *Diabetes Hoy Para el Médico y el Prof. la Salud* **13**, 2814–2822 (2011).
142. Chinopoulos, C. Which way does the citric acid cycle turn during hypoxia? The critical role of α -ketoglutarate dehydrogenase complex. *J. Neurosci. Res.* **91**, 1030–1043 (2013).
143. Hochachka, P. W. & Dressendorfer, R. H. Succinate accumulation in man during exercise. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* **35**, 235–242 (1976).
144. Sanborn, T., Gavin, W. & Berkowitz, S. Augmented conversion of aspartate and glutamate to succinate during anoxia in rabbit heart. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* **6**, (1979).
145. Taegtmeyer, H. Metabolic responses to cardiac hypoxia. Increased production of succinate by rabbit papillary muscles. *Circ. Res.* **43**, 808–815 (1978).
146. Chouchani, E. T. *et al.* Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature* **515**, 431–435 (2014).
147. Owen, O. E., Kalhan, S. C. & Hanson, R. W. The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. *J. Biol. Chem.* **277**, 30409–30412 (2002).
148. Yang, C. *et al.* Glutamine oxidation maintains the TCA cycle and cell survival during impaired mitochondrial pyruvate transport. *Mol. Cell* **56**, 414–424 (2014).
149. Tannahill, G. M. *et al.* Succinate is an inflammatory signal that induces IL- 1β through HIF- 1α . *Nature* **496**, 238–242 (2013).
150. Selak, M. A. *et al.* Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- α prolyl hydroxylase. *Cancer Cell* **7**, 77–85 (2005).
151. Anzai, N., Kanai, Y. & Endou, H. Organic anion transporter family: Current knowledge. *J. Pharmacol. Sci.* **100**, 411–426 (2006).
152. Reddy, A. *et al.* pH-Gated Succinate Secretion Regulates Muscle Remodeling in Response to Exercise. *Cell* **183**, 62-75.e17 (2020).
153. Nigam, S. K. The SLC22 Transporter Family: A Paradigm for the Impact of Drug Transporters on Metabolic Pathways, Signaling, and Disease.

- Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **58**, 663–687 (2018).
154. Volk, C. OCTs, OATs, and OCTNs: Structure and function of the polyspecific organic ion transporters of the SLC22 family. *Wiley Interdiscip. Rev. Membr. Transp. Signal.* **3**, 1–13 (2014).
155. Li, T. T., An, J. X., Xu, J. Y. & Tuo, B. G. Overview of organic anion transporters and organic anion transporter polypeptides and their roles in the liver. *World J. Clin. Cases* **7**, 3915–3933 (2019).
156. Riedmaier, A. E., Nies, A. T., Schaeffeler, E. & Schwab, M. Organic anion transporters and their implications in pharmacotherapy. *Pharmacol. Rev.* **64**, 421–449 (2012).
157. Lozano, E. *et al.* Genetic heterogeneity of SLC22 family of transporters in drug disposition. *J. Pers. Med.* **8**, 1–27 (2018).
158. Schumann, T. *et al.* Solute carrier transporters as potential targets for the treatment of metabolic disease. *Pharmacol. Rev.* **72**, 343–379 (2020).
159. Andrienko, T. N., Pasdois, P., Pereira, G. C., Ovens, M. J. & Halestrap, A. P. The role of succinate and ROS in reperfusion injury – A critical appraisal. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **110**, 1–14 (2017).
160. Prag, H. A. *et al.* Mechanism of succinate efflux upon reperfusion of the ischaemic heart. *Cardiovasc. Res.* **117**, 1188–1201 (2021).
161. Molnár, T. *et al.* γ -Hydroxybutyrate binds to the synaptic site recognizing succinate monocarboxylate: A new hypothesis on astrocyte-neuron interaction via the protonation of succinate. *J. Neurosci. Res.* **86**, 1566–1576 (2008).
162. Pajor, A. M. Sodium-coupled dicarboxylate and citrate transporters from the SLC13 family. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **466**, 119–130 (2014).
163. Bento, J. L. *et al.* Heterogeneity in gene loci associated with type 2 diabetes on human chromosome 20q13.1. *Genomics* **92**, 226–234 (2008).
164. Srisawang, P., Chatsudthipong, A. & Chatsudthipong, V. Modulation of succinate transport in Hep G2 cell line by PKC. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1768**, 1378–1388 (2007).
165. Sadagopan, N. *et al.* Circulating Succinate is Elevated in Rodent Models of Hypertension and Metabolic Disease. *Am. J. Hypertens.* **20**, 1209–1215 (2007).

166. Serena, C. *et al.* Elevated circulating levels of succinate in human obesity are linked to specific gut microbiota. *ISME J.* **12**, 1642–1657 (2018).
167. Aguiar, C. J. *et al.* Succinate causes pathological cardiomyocyte hypertrophy through GPR91 activation. *Cell Commun. Signal.* **12**, 1–17 (2014).
168. He, W. *et al.* Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors. *Nature* **429**, 188–193 (2004).
169. Gilissen, J., Jouret, F., Pirotte, B. & Hanson, J. Insight into SUCNR1 (GPR91) structure and function. *Pharmacol. Ther.* **159**, 56–65 (2016).
170. De Castro Fonseca, M., Aguiar, C. J., Da Rocha Franco, J. A., Gingold, R. N. & Leite, M. F. GPR91: Expanding the frontiers of Krebs cycle intermediates. *Cell Commun. Signal.* **14**, 1–9 (2016).
171. Katritch, V., Cherezov, V. & Stevens, R. C. Structure-Function of the G Protein-Coupled Receptor Superfamily. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **53**, 531–556 (2013).
172. Lückmann, M., Trauelsen, M., Frimurer, T. M. & Schwartz, T. W. Structural basis for GPCR signaling by small polar versus large lipid metabolites—discovery of non-metabolite ligands. *Curr. Opin. Cell Biol.* **63**, 38–48 (2020).
173. Li, X. *et al.* GPR91, a critical signaling mechanism in modulating pathophysiologic processes in chronic illnesses. *FASEB J.* **34**, 13091–13105 (2020).
174. Krzak, G., Willis, C. M., Smith, J. A., Pluchino, S. & Peruzzotti-Jametti, L. Succinate Receptor 1: An Emerging Regulator of Myeloid Cell Function in Inflammation. *Trends Immunol.* **42**, 45–58 (2021).
175. Trauelsen, M. *et al.* Receptor structure-based discovery of non-metabolite agonists for the succinate receptor GPR91. *Mol. Metab.* **6**, 1585–1596 (2017).
176. Beigi, M. & Zell, A. A novel method for classifying subfamilies and sub-subfamilies of G-protein coupled receptors. *Lect. Notes Comput. Sci. (including Subser. Lect. Notes Artif. Intell. Lect. Notes Bioinformatics)* **4345 LNBI**, 25–36 (2006).
177. Louer, E. M. M., Lorés-Motta, L., Ion, A. M., Den Hollander, A. I. & Deen, P. M. T. Single nucleotide polymorphism rs13079080 is associated with

- differential regulation of the succinate receptor 1 (SUCNR1) gene by miRNA-4470. *RNA Biol.* **16**, 1547–1554 (2019).
178. Wettschureck, N. & Offermanns, S. Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol. Rev.* **85**, 1159–1204 (2005).
179. Connors, J., Dawe, N. & Van Limbergen, J. The role of succinate in the regulation of intestinal inflammation. *Nutrients* **11**, 1–12 (2019).
180. Hakak, Y. *et al.* The role of the GPR91 ligand succinate in hematopoiesis. *J. Leukoc. Biol.* **85**, 837–843 (2009).
181. Macias-Ceja, D. C. *et al.* Succinate receptor mediates intestinal inflammation and fibrosis. *Mucosal Immunol.* **12**, 178–187 (2019).
182. Wu, J. Y. *et al.* Cancer-Derived Succinate Promotes Macrophage Polarization and Cancer Metastasis via Succinate Receptor. *Mol. Cell* **77**, 213-227.e5 (2020).
183. Harber, K. J. *et al.* Succinate is an inflammation-induced immunoregulatory metabolite in macrophages. *Metabolites* **10**, 1–14 (2020).
184. Peruzzotti-Jametti, L. *et al.* Macrophage-Derived Extracellular Succinate Licenses Neural Stem Cells to Suppress Chronic Neuroinflammation. *Cell Stem Cell* **22**, 355-368.e13 (2018).
185. Hu, J. *et al.* The MAPK signaling pathway mediates the GPR91-dependent release of VEGF from RGC-5 cells. *Int. J. Mol. Med.* **36**, 130–138 (2015).
186. Toma, I. *et al.* Succinate receptor GPR91 provides a direct link between high glucose levels and rennin release in murine and rabbit kidney. *J. Clin. Invest.* **118**, 2526–2534 (2008).
187. Cho, E. H. Succinate as a regulator of hepatic stellate cells in liver fibrosis. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **9**, 1–5 (2018).
188. Correa, P. R. A. V. *et al.* Succinate is a paracrine signal for liver damage. *J. Hepatol.* **47**, 262–269 (2007).
189. Lei, W. *et al.* Activation of intestinal tuft cell-expressed *sucnr1* triggers type 2 immunity in the mouse small intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, 5552–5557 (2018).
190. Favret, S. *et al.* Deficiency in the metabolite receptor SUCNR1 (GPR91) leads to outer retinal lesions. *Aging (Albany. NY)*. **5**, 427–444 (2013).

191. McCreath, K. J. *et al.* Targeted disruption of the SUCNR1 metabolic receptor leads to dichotomous effects on obesity. *Diabetes* **64**, 1154–1167 (2015).
192. Regard, J. B., Sato, I. T. & Coughlin, S. R. Anatomical Profiling of G Protein-Coupled Receptor Expression. *Cell* **135**, 561–571 (2008).
193. Sapieha, P. *et al.* The succinate receptor GPR91 in neurons has a major role in retinal angiogenesis. *Nat. Med.* **14**, 1067–1076 (2008).
194. Starling, S. Succinate regulates muscle exercise adaptations. *Nat. Rev. Endocrinol.* **16**, 678–679 (2020).
195. Astiarraga, B. *et al.* Impaired succinate response to a mixed meal in obesity and type 2 diabetes is normalized after metabolic surgery. *Diabetes Care* **43**, 2581–2587 (2020).
196. Deen, P. M. T. & Robben, J. H. Succinate receptors in the kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* **22**, 1416–1422 (2011).
197. Robben, J. H. *et al.* Localization of the succinate receptor in the distal nephron and its signaling in polarized MDCK cells. *Kidney Int.* **76**, 1258–1267 (2009).
198. Vargas, S. L., Toma, I., Jung, J. K., Meer, E. J. & Peti-Peterdi, J. Activation of the succinate receptor GPR91 in macula densa cells causes renin release. *J. Am. Soc. Nephrol.* **20**, 1002–1011 (2009).
199. Hallan, S. *et al.* Metabolomics and Gene Expression Analysis Reveal Down-regulation of the Citric Acid (TCA) Cycle in Non-diabetic CKD Patients. *EBioMedicine* **26**, 68–77 (2017).
200. Fahlen, L. A. & MacDonald, M. J. The succinate mechanism of insulin release. *Diabetes* **51**, 2669–2676 (2002).
201. Alarcon, C., Wicksteed, B., Prentki, M., Corkey, B. E. & Rhodes, C. J. Succinate is a preferential metabolic stimulus-coupling signal for glucose-induced proinsulin biosynthesis translation. *Diabetes* **51**, 2496–2504 (2002).
202. Leibowitz, G. *et al.* Mitochondrial regulation of insulin production in rat pancreatic islets. *Diabetologia* **48**, 1549–1559 (2005).
203. Huang, M. & Joseph, J. W. Assessment of the metabolic pathways associated with glucose-stimulated biphasic insulin secretion. *Endocrinology* **155**, 1653–1666 (2014).

204. Mills, E. L. *et al.* Accumulation of succinate controls activation of adipose tissue thermogenesis. *Nature* **560**, 102–106 (2018).
205. Liu, K. *et al.* Scd1 controls de novo beige fat biogenesis through succinate-dependent regulation of mitochondrial complex II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**, 2462–2472 (2020).
206. Ives, S. J. *et al.* The effect of succinic acid on the metabolic profile in high-fat diet-induced obesity and insulin resistance. *Physiol. Rep.* **8**, 1–13 (2020).
207. De Vadder, F. *et al.* Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits. *Cell* **156**, 84–96 (2014).
208. De Vadder, F. *et al.* Microbiota-Produced Succinate Improves Glucose Homeostasis via Intestinal Gluconeogenesis. *Cell Metab.* **24**, 151–157 (2016).
209. Wang, K. *et al.* Succinate and Secondary Bile Acids Produced by Parabacteroides Distasonis Synergistically Modulate Host Metabolism to Alleviate Obesity and Metabolic Dysfunctions. *Cell Rep.* (2019) doi:10.2139/ssrn.3238691.
210. Chen, T. T., Maevsky, E. I. & Uchitel, M. L. Maintenance of homeostasis in the aging hypothalamus: The central and peripheral roles of succinate. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **6**, 1–11 (2015).
211. Zhang, H., Zhang, G., Gonzalez, F. J., Park, S. min & Cai, D. Hypoxia-inducible factor directs POMC gene to mediate hypothalamic glucose sensing and energy balance regulation. *PLoS Biol.* **9**, (2011).
212. Diehl, J. *et al.* Expression and localization of GPR91 and GPR99 in murine organs. *Cell Tissue Res.* **364**, 245–262 (2016).
213. Hamel, D. *et al.* G-protein-coupled receptor 91 and succinate are key contributors in neonatal postcerebral hypoxia-ischemia recovery. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **34**, 285–293 (2014).
214. Lukyanova, L. D., Kirova, Y. I. & Germanova, E. L. Specific Features of Immediate Expression of Succinate-Dependent Receptor GPR91 in Tissues during Hypoxia. *Bull. Exp. Biol. Med.* **160**, 742–747 (2016).
215. Protti, A. *et al.* Succinate recovers mitochondrial oxygen consumption in septic rat skeletal muscle. *Crit. Care Med.* **35**, 2150–2155 (2007).
216. Huffman, K. M. *et al.* Metabolite signatures of exercise training in human

- skeletal muscle relate to mitochondrial remodelling and cardiometabolic fitness. *Diabetologia* **57**, 2282–2295 (2014).
217. Wang, T. *et al.* Succinate induces skeletal muscle fiber remodeling via SUCNR 1 signaling . *EMBO Rep.* **21**, 50461 (2020).
218. Hu, C. *et al.* Muscle-Liver Substrate Fluxes in Exercising Humans and Potential Effects on Hepatic Metabolism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **105**, 1196–1209 (2020).
219. Geubelle, P. *et al.* Identification and pharmacological characterization of succinate receptor agonists. *Br. J. Pharmacol.* **174**, 796–808 (2017).
220. Haffke, M. *et al.* Structural basis of species-selective antagonist binding to the succinate receptor. *Nature* **574**, 581–585 (2019).
221. Hu, J., Li, T., Du, X., Wu, Q. & Le, Y. Z. G protein-coupled receptor 91 signaling in diabetic retinopathy and hypoxic retinal diseases. *Vision Res.* **139**, 59–64 (2017).
222. Saraiva, A. L. *et al.* Succinate receptor deficiency attenuates arthritis by reducing dendritic cell traffic and expansion of Th17 cells in the lymph nodes. *FASEB J.* **32**, 6550–6558 (2018).
223. Keiran, N. *et al.* SUCNR1 controls an anti-inflammatory program in macrophages to regulate the metabolic response to obesity. *Nat. Immunol.* **20**, 581–592 (2019).
224. Lumeng, C. N., Delproposto, J. B., Westcott, D. J. & Saltiel, A. R. Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes. *Diabetes* **57**, 3239–3246 (2008).
225. Wellen, K. E. & Hotamisligil, G. S. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* **112**, 1785–1788 (2003).
226. López-Vicario, C. *et al.* Leukocytes from obese individuals exhibit an impaired SPM signature. *FASEB J.* **33**, 7072–7083 (2019).
227. Ceperuelo-Mallafré, V. *et al.* Erratum: Preoperative circulating succinate levels as a biomarker for diabetes remission after bariatric surgery (*Diabetes Care* (2019) 42 (1956–1965) DOI: 10.2337/dc19-0114). *Diabetes Care* **42**, 2347 (2019).
228. Mills, E. L. *et al.* Succinate Dehydrogenase Supports Metabolic Repurposing of Mitochondria to Drive Inflammatory Macrophages. *Cell*

- 167**, 457-470.e13 (2016).
229. Hui, X. *et al.* Adiponectin Enhances Cold-Induced Browning of Subcutaneous Adipose Tissue via Promoting M2 Macrophage Proliferation. *Cell Metab.* **22**, 279–290 (2015).
230. Pauleau, A.-L. *et al.* Enhancer-Mediated Control of Macrophage-Specific Arginase I Expression. *J. Immunol.* **172**, 7565–7573 (2004).
231. Poh, A. R. & Ernst, M. Targeting macrophages in cancer: From bench to bedside. *Front. Oncol.* **8**, 1–16 (2018).
232. Luan, B. *et al.* CREB pathway links PGE2 signaling with macrophage polarization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 15642–15647 (2015).
233. Avni, D., Ernst, O., Philosoph, A. & Zor, T. Role of CREB in modulation of TNF α and IL-10 expression in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. *Mol. Immunol.* **47**, 1396–1403 (2010).
234. Mauer, J. *et al.* Signaling by IL-6 promotes alternative activation of macrophages to limit endotoxemia and obesity-associated resistance to insulin. *Nat. Immunol.* **15**, 423–430 (2014).
235. Reilly, S. M. & Saltiel, A. R. Countering inflammatory signals in obesity. *Nat. Immunol.* **15**, 410–411 (2014).
236. Engin, A. Adiponectin-Resistance in Obesity. in vol. 960 415–441 (2017).
237. Peti-Peterdi, J., Gevorgyan, H., Lam, L. & Riquier-Brison, A. Metabolic control of renin secretion. *Pflugers Arch.* **465**, 53–8 (2013).
238. Wang, G. X. *et al.* Regulation of UCP1 and Mitochondrial Metabolism in Brown Adipose Tissue by Reversible Succinylation. *Mol. Cell* **74**, 844-857.e7 (2019).
239. Kovatcheva-Datchary, P. *et al.* Dietary Fiber-Induced Improvement in Glucose Metabolism Is Associated with Increased Abundance of *Prevotella*. *Cell Metab.* **22**, 971–982 (2015).
240. Xu, G. & Song, M. Recent advances in the mechanisms underlying the beneficial effects of bariatric and metabolic surgery. *Surg. Obes. Relat. Dis.* **17**, 231–238 (2021).
241. Koliaki, C., Liatis, S., le Roux, C. W. & Kokkinos, A. The role of bariatric surgery to treat diabetes: current challenges and perspectives. *BMC Endocr. Disord.* **17**, 50 (2017).
242. Koh, Z. J. *et al.* Metabolic outcomes after revisional bariatric surgery: a

- systematic review and meta-analysis. *Surg. Obes. Relat. Dis.* **16**, 1442–1454 (2020).
243. Astiarraga, B. *et al.* Biliopancreatic diversion in nonobese patients with type 2 diabetes: Impact and mechanisms. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **98**, 2765–2773 (2013).
244. Casajoana, A. *et al.* Predictive Value of Gut Peptides in T2D Remission: Randomized Controlled Trial Comparing Metabolic Gastric Bypass, Sleeve Gastrectomy and Greater Curvature Plication. *Obes. Surg.* **27**, 2235–2245 (2017).
245. Camastra, S. *et al.* Long-term effects of bariatric surgery on meal disposal and β -cells function in diabetic and nondiabetic patients. *Diabetes* **62**, 3709–3717 (2013).
246. Wang, G. F. *et al.* Predictive Factors of Type 2 Diabetes Mellitus Remission Following Bariatric Surgery: a Meta-analysis. *Obes. Surg.* **25**, 199–208 (2015).
247. Huang, X. *et al.* Predictors of glycemic control after sleeve gastrectomy versus Roux-en-Y gastric bypass: A meta-analysis, meta-regression, and systematic review. *Surg. Obes. Relat. Dis.* **14**, 1822–1831 (2018).
248. Lee, Y. C., Lee, W. J. & Liew, P. L. Predictors of remission of type 2 diabetes mellitus in obese patients after gastrointestinal surgery. *Obes. Res. Clin. Pract.* **7**, e494–e500 (2013).
249. Dixon, J. B. *et al.* Predicting the glycemic response to gastric bypass surgery in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* **36**, 20–26 (2013).
250. Hall, T. C., Pellen, M. G. C., Sedman, P. C. & Jain, P. K. Preoperative factors predicting remission of type 2 diabetes mellitus after Roux-en-Y Gastric bypass surgery for obesity. *Obes. Surg.* **20**, 1245–1250 (2010).
251. Lee, W. J. *et al.* Laparoscopic sleeve gastrectomy for type 2 diabetes mellitus: Predicting the success by ABCD score. *Surg. Obes. Relat. Dis.* **11**, 991–996 (2015).
252. Still, C. D. *et al.* Preoperative prediction of type 2 diabetes remission after Roux-en-Y gastric bypass surgery: A retrospective cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **2**, 38–45 (2014).
253. Aron-Wisnewsky, J. *et al.* The advanced-DiaRem score improves prediction of diabetes remission 1 year post-Roux-en-Y gastric bypass.

- Diabetologia* **60**, 1892–1902 (2017).
254. Pucci, A. *et al.* Type 2 diabetes remission 2 years post Roux-en-Y gastric bypass and sleeve gastrectomy: the role of the weight loss and comparison of DiaRem and DiaBetter scores. *Diabet. Med.* **35**, 360–367 (2018).
255. King, W. C., Hinerman, A. S., Belle, S. H., Wahed, A. S. & Courcoulas, A. P. Comparison of the Performance of Common Measures of Weight Regain after Bariatric Surgery for Association with Clinical Outcomes. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **320**, 1560–1569 (2018).
256. Debédát, J. *et al.* Long-term Relapse of Type 2 Diabetes After Roux-en-Y Gastric Bypass: Prediction and clinical relevance. *Diabetes Care* **41**, 2086–2095 (2018).
257. Fultang, J., Chinaka, U., Rankin, J., Bakhshi, A. & Ali, A. Preoperative Bariatric Surgery Predictors Of Type 2 Diabetes Remission. *J. Obes. Metab. Syndr.* (2021) doi:10.7570/jomes20084.
258. Borgeraas, H., Hofsø, D., Hertel, J. K. & Hjelmæsæth, J. Comparison of the effect of Roux-en-Y gastric bypass and sleeve gastrectomy on remission of type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Obes. Rev.* **21**, 1–11 (2020).
259. ZILBERSTEIN, B., SANTO, M. A. & CARVALHO, M. H. CRITICAL ANALYSIS OF SURGICAL TREATMENT TECHNIQUES OF MORBID OBESITY. *ABCD. Arq. Bras. Cir. Dig. (São Paulo)* **32**, 10–13 (2019).

