



**ESTEATOSIS DE ORIGEN DIETÉTICO: ¿LA INFLAMACIÓN Y LA
OXIDACIÓN ACTÚAN DE FORMA COORDINADA?
Fernando Rodríguez Sanabria**

**ISBN: 978-84-694-0296-2
Dipòsit Legal: T-203-2011**

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

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

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



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

**Centre de Recerca Biomèdica
Hospital Universitari Sant Joan
Facultat de Medicina i Ciències de la Salut
Departament de Medicina i Cirurgia**

**Esteatosis de origen dietético: ¿La
inflamación y la oxidación actúan de
forma coordinada?**

Fernando Rodríguez Sanabria

Reus 2010

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTEATOSIS DE ORIGEN DIETÉTICO: ¿LA INFLAMACIÓN Y LA OXIDACIÓN ACTÚAN DE FORMA COORDINADA?

Fernando Rodríguez Sanabria

ISBN:978-84-694-0296-2/T-203-2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTEATOSIS DE ORIGEN DIETÉTICO: ¿LA INFLAMACIÓN Y LA OXIDACIÓN ACTÚAN DE FORMA COORDINADA?

Fernando Rodríguez Sanabria

ISBN:978-84-694-0296-2/T-203-2011

A mi padre

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTEATOSIS DE ORIGEN DIETÉTICO: ¿LA INFLAMACIÓN Y LA OXIDACIÓN ACTÚAN DE FORMA COORDINADA?

Fernando Rodríguez Sanabria

ISBN:978-84-694-0296-2/T-203-2011



Autorització del director/a o codirector/s/a/es de la tesi doctoral

| DADES IDENTIFICATIVES DE LA TESI DOCTORAL | |
|--|---|
| Títol de la tesi doctoral Esteatosis de origen dietético: ¿La inflamación y la oxidación actúan de forma coordinada? | |
| Doctorand/a Fernando Rodríguez Sanabria | |
| Programa de Doctorat / Programa Oficial de Postgrau Patología Vascular y Alteraciones del Metabolismo | |
| Departament Medicina i Cirurgia | Grup de recerca : Centre de Recerca Biomèdica (CRB) |
| Director/a Jorge Joven Maried | Correu electrònic del Director/a jjoven@grupsagessa.com |
| Codirector/a | Correu electrònic del Codirector/a |
| Tutor/a (si s'escau) | Correu electrònic del Tutor/a |

| INFORME DEL DIRECTOR DE TESI | | |
|--|----|----|
| El/s (co)director/s sotasignats emeten l'informe de la tesi doctoral presentada a tràmit de dipòsit, en base a la revisió dels següents elements de qualitat: | | |
| | SI | NO |
| La tesi consisteix en un treball original de recerca | X | |
| El títol reflecteix acuradament el contingut de la tesi | X | |
| Les hipòtesis i/o els objectius de la tesi estan clarament formulats | X | |
| La metodologia està descrita | X | |
| Hi consta el procediment | X | |
| Hi consten els resultats i la discussió dels mateixos | X | |
| Les conclusions de la tesi corresponen a les hipòtesis i/o objectius formulats | X | |
| La bibliografia està ben reflectida | X | |
| D'aquesta tesi es deriven les següents aportacions científiques: | | |
| <p>1. Differential response of two models of genetically modified mice fed with high fat and cholesterol diets: relationship to study of non-alcoholic steatohepatitis Fernando Rodríguez-Sanabria, Anna Rull, Gerard Aragonès, Raúl Beltrán-Debón, Carlos Alonso-Villaverde, Jordi Camps, Jorge Joven Molecular Cell Biochemistry (2010) 343: 59-66</p> | | |
| <p>2. Tissue distribution and expression of paraoxonases and chemokines in mouse: the ubiquitous and joint localisation suggest a systemic and coordinated role Fernando Rodríguez-Sanabria, Anna Rull, Raúl Beltrán-Debón, Gerard Aragonès, Jordi Camps, Bharti Mackness, Michael Mackness, Jorge Joven Journal of Molecular Histology (2010) (doi: 10.1007/s10735-010-9299-x)</p> | | |
| Altres comentaris sobre la qualitat de la tesi: | | |
| | | |
| | | |

I en conclusió, s'emet l'informe FAVORABLE pel tràmit de dipòsit de la tesi doctoral i posterior defensa pública.

Reus, 8 d'Octubre de 2010

Jorge Joven Maried
 Director de la tesi

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTEATOSIS DE ORIGEN DIETÉTICO: ¿LA INFLAMACIÓN Y LA OXIDACIÓN ACTÚAN DE FORMA COORDINADA?

Fernando Rodríguez Sanabria

ISBN:978-84-694-0296-2/T-203-2011

Agradecimientos

Quisiera expresar mi gratitud por siempre a todos aquellos que de una u otra forma colaboraron para que llegar al final fuera posible y que con su paciencia y amistad me dieron fuerza para no desfallecer:

A mi director de tesis, Prof. Jorge Joven, gracias por haber permitido que viviera esta experiencia; comienzo a participar del mundo maravilloso de la ciencia; espero corresponder a la confianza que has depositado en mí. Gracias por tu consejo oportuno y por estimular con tu ejemplo a este aprendiz de “científico”.

Al Dr. Carlos Alonso-Villaverde, por su consejo y paciencia, por su apoyo incondicional a mi trabajo, por su buen humor en los momentos más difíciles y por compartir sus conocimientos y la vida con todos nosotros los integrantes del CRB. Gracias Amigo!!!

Al Dr. Jordi Camps, por su apoyo desinteresado para que pudiera llegar a la meta después de una larga travesía.

A mis compañeros de lucha con los que compartimos momentos inolvidables en el laboratorio:

Anna: Gracias por tu amistad y paciencia, intentaré “no olvidar” que debo fijarme en los pequeños detalles. Vivimos momentos tristes y momentos muy especiales como parte de la vida que compartimos durante estos cuatro años. Te recordaré siempre. Tu futuro es grande. Suerte en tu vida y gracias por tu valiosa ayuda y tu inmensa paciencia.

Gerard: En momentos difíciles para mí en los cuales llegue a pensar que no podía seguir, tu sentido del humor y tu apoyo fueron

fundamentales para continuar. Tienes madera de maestro. Gracias por compartir tus conocimientos y por toda tu ayuda.

Raúl: “Ala hermano”, tienes lo que se necesita para sobresalir en ciencia: paciencia y tesón; pero lo más importante es que tienes ese “don de gentes” que te hace una persona especial para todo el que comparte tu amistad. “Ala chino”, compartimos ciencia pero sobre todo un trozo de vida. Tienes un buen futuro por delante. Y gracias por toda tu ayuda.

Judith: Fuiste una amiga y una compañera especial, en mi mente quedan muchos recuerdos vividos en el CRB en donde estas tu. Eres una persona admirable y una excelente científica ojalá alguna vez nos volvamos a encontrar. Suerte en tu vida.

Esther: Eres la nueva sangre del CRB. En el poco tiempo compartido fuiste buena amiga. Gracias, y adelante, sé que lo harás bien.

Alba: eres genial y fuiste de gran ayuda en momentos difíciles e igualmente una gran amiga.

A mis compañeros del Bioterio: Amparo, Juan y Esperanza por su ayuda y amistad, los recordaré siempre.

A Fátima Sabench por su ayuda y amistad.

A los compañeros del laboratorio central: Samuel y Carmen, Nuria, Rosa, José Maria, Conchi, Maria José y al duo dinámico: Xavi y Carles y en general a todos los que pertenecen al laboratorio y que de una u otra forma compartieron momentos de su vida conmigo, Gracias.

A las “señoras del Biobanco”: Lidia, Carmen y Jordina por los favores recibidos, por su apoyo y amistad.

A Mónica y Ester de anatomía patológica por su apoyo y amistad.

Ángeles: gracias por los momentos vividos. Tu amistad hizo más llevadera mi soledad.

A mi padre, porque desde donde esta le ha dado impulso a mi alma para seguir.

A mi madre, que con paciencia y amor infinito me espera allá en mi lejana tierra.

Y finalmente, a mi familia: vivo por ellos y para ellos, su apoyo y paciencia fueron la fuerza que me permitió culminar con éxito esta “aventura”.

A mi esposa, Gloria Marina: Solo espero que estos estudios que culmino sean dignos de tu amor y capacidad de sacrificio. No los habría podido terminar sin tu apoyo. Este logro es tuyo, Gracias mi amor.

A mis hijos Daniel Fernando, Camilo Enrique y José Manuel, la razón de mi existencia, gracias por vuestro apoyo incondicional, por vuestra paciencia y por creer en mí. Vosotros sabéis que os amo.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTEATOSIS DE ORIGEN DIETÉTICO: ¿LA INFLAMACIÓN Y LA OXIDACIÓN ACTÚAN DE FORMA COORDINADA?

Fernando Rodríguez Sanabria

ISBN:978-84-694-0296-2/T-203-2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTEATOSIS DE ORIGEN DIETÉTICO: ¿LA INFLAMACIÓN Y LA OXIDACIÓN ACTÚAN DE FORMA COORDINADA?

Fernando Rodríguez Sanabria

ISBN:978-84-694-0296-2/T-203-2011

Índice

| | |
|---|----|
| Abreviaturas | 4 |
| 1. Presentación y justificación | 9 |
| 2. Introducción | 15 |
| 2.1 Relación entre el tejido adiposo y el hígado en la obesidad | 16 |
| 2.1.1. Mediadores inflamatorios y resistencia a la insulina en obesidad | 21 |
| 2.1.2. Obesidad y estrés oxidativo | 24 |
| 2.2. Esteatosis hepática no alcohólica (NAFLD) | 27 |
| 2.3. Modelos animales | 32 |
| 2.3.1. Modelos de obesidad y resistencia a la insulina | 33 |
| 2.3.2. Modelos de hiperlipidemia | 34 |
| 2.3.2.1. Ratón deficiente en el gen de la apolipoproteína E (ApoE ^{-/-}) | 34 |
| 2.3.2.2. Ratón deficiente en el receptor de las LDL (LDLR ^{-/-}) | 36 |
| 2.4. Quimiocinas | 37 |
| 2.4.1. Proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) | 38 |
| 2.4.2. Proteína quimioatrayente de monocitos 2 (MCP-2) | 41 |
| 2.4.3. Proteína quimioatrayente de monocitos 3 (MCP-3) | 42 |
| 2.4.4. Proteína quimioatrayente de monocitos 5 (MCP-5) | 43 |
| 2.5. CCR-2 | 44 |
| 2.6. Las Paraoxonasas (PON) | 45 |
| 2.6.1. Paraoxonasa 1 (PON1) | 46 |
| 2.6.2. Paraoxonasa 2 (PON2) | 48 |
| 2.6.3. Paraoxonasa 3 (PON3) | 48 |

| | |
|--|-----|
| 3. Hipótesis | 51 |
| 4. Objetivos | 55 |
| 5. Materiales y Métodos | 59 |
| 5.1. Estudio 1 | 60 |
| 5.1.1. Diseño del estudio | 60 |
| 5.1.2. Determinaciones bioquímicas | 61 |
| 5.1.3. Prueba de tolerancia a la glucosa | 62 |
| 5.1.4. Concentración de colesterol y triglicéridos hepáticos | 62 |
| 5.1.5. Evaluación histológica de la lesión aterosclerótica y el tejido hepático | 63 |
| 5.1.6. Expresión Génica | 64 |
| 5.1.7. Análisis estadístico | 66 |
| 5.2. Estudio 2 | 67 |
| 5.2.1. Diseño del estudio | 67 |
| 5.2.2. Análisis inmunohistoquímicos | 68 |
| 5.2.3. Expresión génica | 69 |
| 6. Resultados | 73 |
| 6.1. Estudio 1 | 75 |
| 6.2. Estudio 2 | 87 |
| 7. Discusión General | 99 |
| 8. Conclusiones Finales | 113 |
| 9. Bibliografía | 117 |

Abreviaturas

AG: Ácidos grasos.

AP-1: Activator protein 1.

ApoE^{-/-}: Cepa de ratones deficientes en la apolipoproteína E.

CCL2: Quimiocina con motivo CC Ligando 2. También llamada MCP-1.

CCL₄: Tetracloruro de carbono.

CCR2: Chemokine (CC motif) receptor 2.

HDL: Lipoproteína de alta densidad.

IDL: Lipoproteína de densidad intermedia.

IL1 β , IL6: Interleucinas 1beta y 6, respectivamente.

IMC: Índice de masa corporal.

iNOS: Sintasa del óxido nítrico inducible.

IRS-1: Sustrato del receptor de la insulina-1.

JNK: proteína c-jun N-terminal cinasa.

LDL: Lipoproteína de baja densidad.

LDLR^{-/-}: Cepa de ratones deficientes en el receptor de las LDL.

Lep^{ob/ob}: Cepa de ratones deficientes en Leptina.

LepR^{db/db}: Cepa de ratones deficientes en el receptor de la Leptina.

LXR: Receptor X del hígado.

MAPK: Mitogen-activated protein kinase.

MCP-1^{-/-}LDLR^{-/-}: Cepa de ratones doble knockout deficientes en MCP-1 y receptor de las LDL.

MCP-1: Proteína quimioatrayente de monocitos-1. Nombre sistemático CCL2.

MCP-2: Proteína quimioatrayente de monocitos-2. Nombre sistemático CCL8.

MCP-3: Proteína quimioatrayente de monocitos-3. Nombre sistemático CCL7.

MCP-5: Proteína quimioatrayente de monocitos-5. Nombre sistemático CCL12.

MCP-1: Proteína inducida por MCP-1.

NADPH oxidasa: Nicotina adenina dinucleótido deshidrogenasa oxidasa.

NAFLD: Enfermedad del hígado graso no alcohólica.

NAFLD: Nonalcoholic fatty liver disease.

NASH: Esteatohepatitis no alcohólica.

NFkB: Factor nuclear kB.

NO: Óxido Nítrico.

OMS: Organización mundial de la salud.

PAI-1: Inhibidor del activador del plasminógeno- 1.

PCR: Proteína C reactiva.

PDX-1: Pancreatic and duodenal homeobox-1

PI3K: 3-Fosfoinositol kinasa.

PON1, 2, 3: Paraoxonasa 1, 2 y 3.

PPAR: Peroxisome proliferator-activated receptor.

PPAR α : Peroxisome proliferator-activated receptor α .

PPAR β/δ : Peroxisome proliferator.activated receptor β/δ .

PPAR γ : Peroxisome proliferator.activated receptor γ .

RE: Retículo endoplasmático.

RI: Resistencia a la insulina.

ROS: Especies reactivas del oxígeno.

SM: Síndrome metabólico.

SNC: Sistema nervioso central.

Th 1: Linfocito T helper.

TLR: Toll-like receptor.

TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa.

VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTEATOSIS DE ORIGEN DIETÉTICO: ¿LA INFLAMACIÓN Y LA OXIDACIÓN ACTÚAN DE FORMA COORDINADA?

Fernando Rodríguez Sanabria

ISBN:978-84-694-0296-2/T-203-2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTEATOSIS DE ORIGEN DIETÉTICO: ¿LA INFLAMACIÓN Y LA OXIDACIÓN ACTÚAN DE FORMA COORDINADA?

Fernando Rodríguez Sanabria

ISBN:978-84-694-0296-2/T-203-2011

1. **P**resentación y Justificación

Prácticamente en todo el mundo, la obesidad y el sobrepeso ocasionado por un consumo excesivo de nutrientes ricos en carbohidratos, lípidos y colesterol se ha convertido en las últimas décadas en un problema grave de salud pública que afecta tanto a adultos como a niños. En un organismo con sobrepeso la consecuencia bioquímica es el desequilibrio energético y el estrés metabólico que produce una respuesta inflamatoria y oxidante crónica.

Desde que el ser humano inició su trayectoria evolutiva sobre la tierra, ha tenido que enfrentarse y superar periodos de hambruna y enfermedades que constantemente lo han amenazado. La supervivencia de un organismo multicelular ha dependido por un lado de su habilidad para almacenar energía utilizada en épocas de difícil disponibilidad de nutrientes y por otro lado, la capacidad para luchar contra las infecciones y los daños causados por estas. Sistemas metabólico e inmunológico son por tanto los requerimientos más básicos a través de la evolución animal y muchos sistemas sensibles a patógenos y nutrientes han sido conservados desde organismos como bacterias e insectos hasta los animales más complejos. No es sorprendente que el metabolismo y el sistema inmune hayan evolucionado juntos aunque de forma interdependiente. Varias hormonas, citocinas, proteínas de señalización, factores de transcripción y lípidos bioactivos participan en ambos sistemas. Además

de usar los mismos mecanismos metabólicos e inmunes se pueden regular uno al otro. La respuesta inflamatoria normal necesita de vías metabólicas activas para desviar la energía según las necesidades del sistema inmune y para esto moviliza los lípidos almacenados que juegan un papel importante en la lucha contra la infección durante la respuesta de fase aguda. La respuesta inflamatoria favorece un estado catabólico y suprime vías anabólicas, tales como la vía de señalización de la insulina. La integración del metabolismo y la del sistema inmune la cual, bajo condiciones normales es beneficiosa para mantener una buena salud, se vuelve deletérea cuando cambia el microambiente celular. Ejemplo de esto es la inmunosupresión característica de individuos malnutridos o desnutridos. En la actualidad existen en el mundo 1200 millones (2009) de personas que sufren de hambre. Sin embargo, en el siglo pasado la balanza se inclinó también para el otro lado, y una cantidad parecida sufre de sobrepeso y obesidad ocasionados por una disminución drástica en la actividad física y por un consumo desmedido de alimentos ricos en lípidos y carbohidratos. Con la aparición de esta sobrecarga metabólica crónica aparecieron nuevos problemas que pusieron de manifiesto la unión entre metabolismo e inmunidad incluyendo enfermedades inflamatorias ligadas a la obesidad: diabetes, enfermedad del hígado graso (esteatosis), hipertensión y aterosclerosis. Queda claro entonces, que entre las

muchas razones para mantener un peso saludable está el paradigma de que un desequilibrio metabólico lleva a un desequilibrio inmune con inanición e inmunosupresión en un extremo de la balanza y obesidad y enfermedad inflamatoria y oxidante en el otro (1).

En la introducción de esta tesis disertaremos sobre como el metabolismo del tejido adiposo y el del hígado están alterados en la obesidad y de la participación de algunas células del sistema inmune en procesos inflamatorios y oxidativos que favorecen un estado crónico de producción de moléculas que degeneran en la aparición de resistencia a la insulina. Esta resistencia a la insulina, hace que moléculas como los ácidos grasos y la glucosa estén aumentadas en el plasma y que en el hígado sean convertidos en triglicéridos. Posiblemente esta sea una de las causas metabólicas de la aparición de esteatosis hepática en individuos obesos.

En otro apartado, haremos referencia a los modelos animales utilizados en el estudio de la esteatosis hepática y finalizaremos la introducción con una revisión corta de dos familias de proteínas que están involucradas en procesos inflamatorios y antioxidantes como son las quimiocinas y las paraoxonasas.

Por otra parte, en el primer artículo presentado, planteamos que ante un estímulo nutricional dos modelos animales que se utilizan para el

estudio de la esteatosis presentan una respuesta metabólica hepática diferente. y en el segundo artículo demostramos que quimiocinas y paraoxonasas se expresan en los mismos tejidos del ratón lo que sugiere una acción coordinada entre procesos oxidativos y antioxidantes en donde participan estas moléculas. Nuestros resultados demuestran que en el hígado de los ratones utilizados se puede presentar esteatosis sin respuesta inflamatoria y a su vez que puede existir inflamación hepática sin presencia de esteatosis ante el mismo estímulo nutricional y que este resultado depende de la carga génica del modelo animal utilizado. Este resultado podría tener alguna aplicación para comprender mejor el proceso de la esteatosis hepática en los seres humanos.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTEATOSIS DE ORIGEN DIETÉTICO: ¿LA INFLAMACIÓN Y LA OXIDACIÓN ACTÚAN DE FORMA COORDINADA?

Fernando Rodríguez Sanabria

ISBN:978-84-694-0296-2/T-203-2011

2. **I**nroducción

2.1. **R**elación entre el tejido adiposo y el hígado en la obesidad

La Obesidad es definida como la anormal o excesiva acumulación de grasa consecuencia de una ingesta calórica superior al gasto energético que pone en riesgo la salud del individuo que la padece. Las definiciones más comúnmente usadas fueron establecidas por la OMS en 1997 y publicadas en el 2000. Ellas están basadas en el IMC, definido como el cociente entre el peso en kg y la altura en m² (peso/talla²). El IMC tiene en cuenta la masa grasa pero no su distribución (2).

Muchos estudios prospectivos han mostrado que la distribución de la grasa corporal perjudicial (obesidad central o abdominal) en el ser humano se asocia con la aparición de enfermedades como la aterosclerosis, diabetes o la esteatosis hepática que tiene como base común la inflamación crónica y la resistencia a la insulina.

Se plantea así, una relación muy cercana entre sistemas de respuesta inmune y metabólica que tiene su origen en la evolución animal. Los tejidos y células que controlan funciones metabólicas e inmunes claves en animales superiores evolucionaron de estructuras ancestrales comunes (**Figura 1**). Una de tales estructuras es el cuerpo graso de la

drosophila el cual incorpora células equivalentes al tejido hepático, al tejido adiposo y a las células del sistema inmune. Este cuerpo graso es importante para censar la disponibilidad de energía y de nutrientes y coordinar la respuesta metabólica apropiada. Este también es el sitio para coordinar la respuesta a patógenos con el estatus metabólico. En organismos superiores el hígado, el tejido adiposo y las células del sistema inmune se han especializado dentro de unidades u órganos funcionales distintos. Por lo tanto es posible imaginar que vías comunes regulan funciones metabólicas como del sistema inmune. Esto podría permitir que los nutrientes actúen a través de sistemas que censan patógenos tales como los receptores Toll-like dando la posibilidad a que nutricionalmente o metabólicamente se pueda inducir una respuesta inflamatoria.

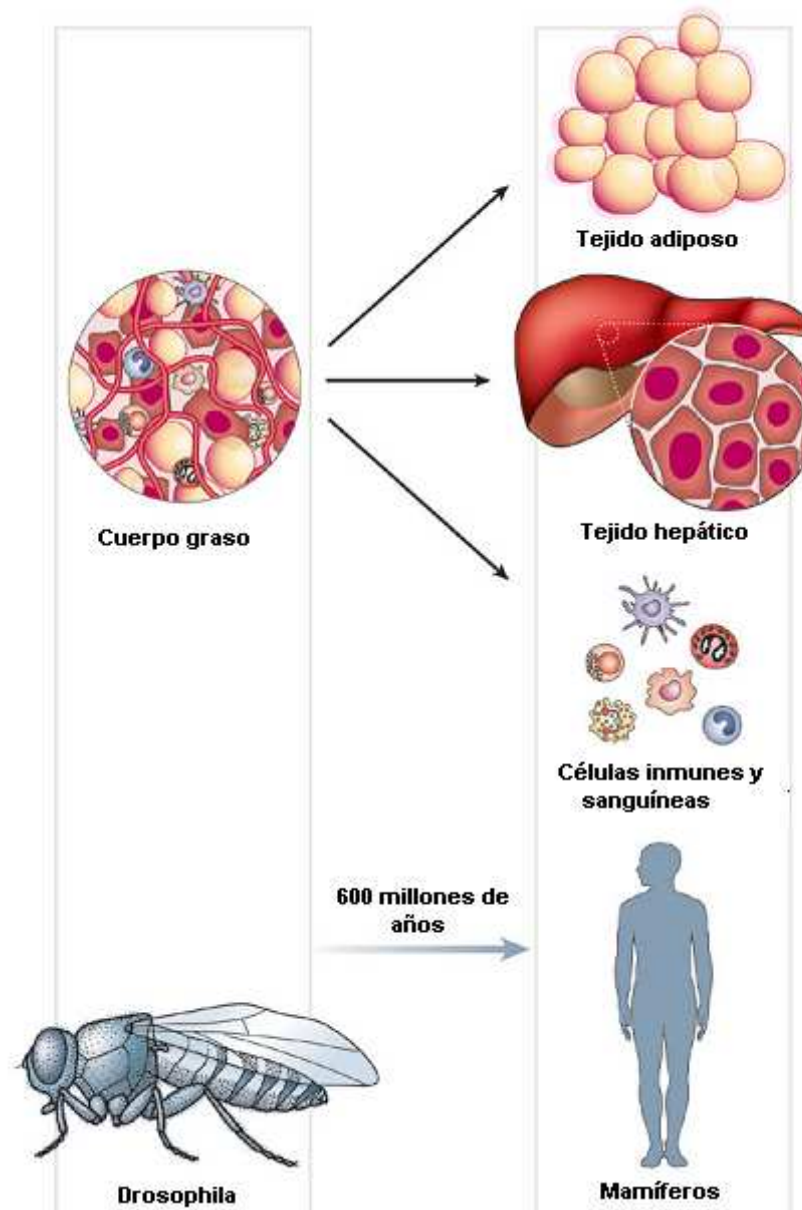


Figura 1. Evolución del tejido adiposo, el hígado y el sistema hematopoyético dentro de distintos órganos en los mamíferos. En el cuerpo graso de la drosophila células parecidas a adipocitos y hepatocitos son afectadas por células del sistema inmune del animal. En los mamíferos, hepatocitos y adipocitos en órganos diferentes también son afectados por células del sistema inmune que son capaces de regular respuestas metabólicas que afectarán a todo el organismo. Adaptada de la referencia 3.

Así, tenemos que a partir de la inflamación crónica del tejido adiposo presente en la obesidad, se potencia su capacidad endocrina produciendo moléculas inflamatorias (MCP-1 y $\text{TNF}\alpha$), moléculas que censan la homeostasis energética (leptina, adiponectina o resistina), moléculas que inducen resistencia a la insulina (resistina), moléculas que alteran la coagulación sanguínea (PAI-1), que afectarán de manera drástica el metabolismo de los tejidos del resto del organismo en especial al hígado, páncreas y músculo (**Figura 2**) (3).

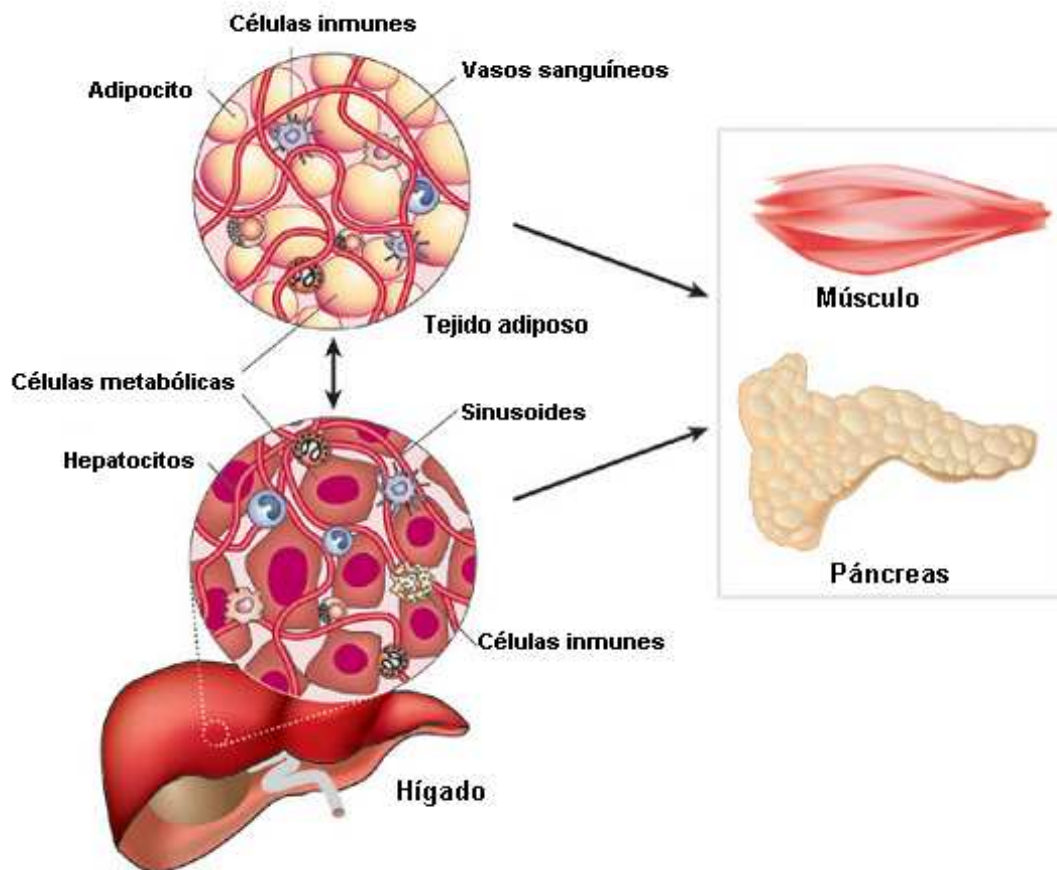


Figura 2. Proximidad de las células metabólicas (adipocitos y hepatocitos) y células del sistema inmune (macrófagos, células de Kupffer, linfocitos y células dendríticas) en el tejido adiposo y el hígado. Esa proximidad permite una interacción muy cercana entre esos grupos de células que en el caso de enfermedades como la obesidad producirán importantes mediadores inflamatorios que afectarán el metabolismo de todo el organismo. Adaptada de referencia 3.

2.1.1. **M**ediadores inflamatorios y resistencia a la insulina en obesidad

Varios estudios han demostrado la significativa asociación entre cantidad de tejido adiposo visceral y concentraciones circulantes de IL-6, TNF α , MCP-1 y PCR (20,21). Adipocitos de gran tamaño tales como los encontrados en un estado de producción de energía crónica producen más ácidos grasos libres (AG), los cuales son potentes activadores de los receptores Toll Like-4 (TLR4). Los AG derivados de los adipocitos y también de la dieta inducen (a través de los receptores TLR4) una respuesta inflamatoria en macrófagos, adipocitos y células musculares. El tejido adiposo visceral junto a los macrófagos que lo infiltran, funcionan como un órgano endocrino activo capaz de secretar una gran variedad de citocinas inflamatorias con funciones claves en el desarrollo de resistencia a la insulina (RI). Los macrófagos recientemente han sido reconocidos como las mayores fuentes de moléculas inflamatorias; los M1 que secretan altas cantidades de mediadores pro-inflamatorios y los M2, macrófagos que producen en menor cantidad esos mediadores. En la obesidad el equilibrio entre los M1 y M2 se rompe y hay una gran producción de citocinas de los macrófagos que crean un estado subclínico de inflamación que conduce a una respuesta insulínica alterada. Recientes estudios, han

demostrado que la activación de los macrófagos es regulada por metabolitos lipídicos, a través de receptores nucleares de factores de transcripción y que una alteración de estos receptores en el macrófago pueden llevar a resistencia a la insulina. Los receptores nucleares son una superfamilia de factores de transcripción activados por ligandos, que controlan la transcripción de genes diana a través de mecanismos directos o indirectos. Directamente, los receptores nucleares se pueden unir a secuencias específicas dentro de la región promotora activando o desactivando la expresión de genes específicos, atrayendo o liberando coactivadores o correpresores (4). Indirectamente, los receptores nucleares, pueden trans-reprimir la transcripción de ciertos genes controlados por otros factores de transcripción como es el caso del factor nuclear kappa-B (NFkB) o el activador de proteínas-1 (AP-1). (5,6). Hacen parte de la familia de los receptores nucleares, los activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs), que pueden ser activados por los ácidos grasos libres, eicosanoides y prostaglandinas, y los receptores X del hígado (LXR). Estos sensores lipídicos juegan un papel importante en el control del metabolismo lipídico. Sin embargo, los receptores nucleares son afectados por obesogenes medioambientales tales como ftalatos, tintes orgánicos, bisfenol A y xenobióticos que interfieren con sus vías de señalización, lo cual se cree es una de las causas de aparición de la obesidad mórbida (7). Además la evidencia

de la última década ha demostrado que los PPARs y los LXRs tienen importantes efectos antiinflamatorios y pueden controlar la activación de los macrófagos, sugiriendo un potencial en la medicación de la RI. Por otra parte los ácidos grasos libres producidos desde el tejido adiposo, inducen estrés oxidativo en la célula beta. Si el estímulo es decir los ácidos grasos continúan llegando en forma crónica a estas células, se disminuye la producción de insulina (**Figura 3**).

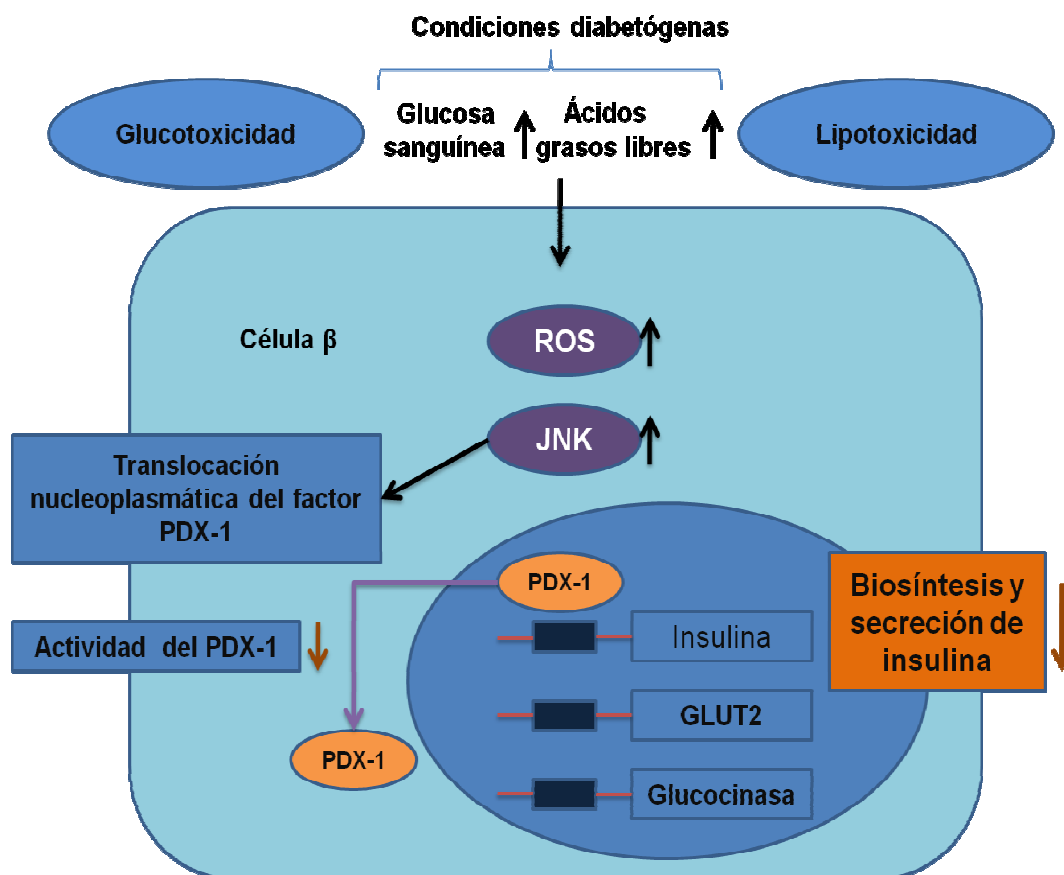


Figura 3. La célula Beta es una de las más afectadas por aumentos de glucosa y ácidos grasos en el plasma. En su interior se aumenta las ROS y hay activación de la proteína c-junc N terminal Kinasa (JNK) la cual induce translocación del núcleo al citoplasma del factor de transcripción PDX-1 necesario para la transcripción de los genes de la insulina, el transportador de glucosa GLUT2 y el de la glucocinasa.

2.1.2. **O**besidad y estrés oxidativo

El estrés oxidativo parece iniciarse en el retículo endoplasmático (RE) del adipocito, ocasionado por las especies reactivas del oxígeno (ROS) (8). El RE es principalmente reconocido por ser responsable de la formación, ensamble y posterior modificación de proteínas solubles y de proteínas de membrana (9). Descubrimientos recientes han relacionado el estrés del retículo endoplasmático con la generación y acumulación de peróxido de hidrógeno. Otra molécula que induce acumulación de estas moléculas altamente reactivas en el interior del adipocito es la NADPH oxidasa (**Figura 4**), la cual cuando es activada disminuye los sistemas antioxidantes de la célula como la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa y la catalasa (10).

Estudios con tejido hepático y adiposo en ratones obesos muestran un aumento en la actividad de la proteína c-jun N-terminal cinasa (JNK) que favorece la fosforilación de los residuos de serina del receptor de la insulina (IRS-1) que tiene como consecuencia la inhibición de la acción de la insulina. Este efecto es mediado por el factor de transcripción XBP-1. Aunque hígado y tejido adiposo son afectados por el estrés oxidativo, se ha demostrado utilizando ratones obesos que el peróxido

de hidrógeno se incrementa en mayor proporción en el tejido adiposo que en otros tejidos como hígado, músculo esquelético y aorta sugiriendo que el tejido adiposo es la mayor fuente de ROS en el plasma. Otras consecuencias del estrés oxidativo presente en individuos obesos han sido publicadas en diversos estudios y hacen referencia al daño en vías de la secreción de insulina de las células β , alteraciones en el transporte de glucosa en el músculo y tejido adiposo, aumento de la aterosclerosis, aumento de la presión sanguínea, aumento en la esteatosis e incremento de las concentraciones de MCP-1.

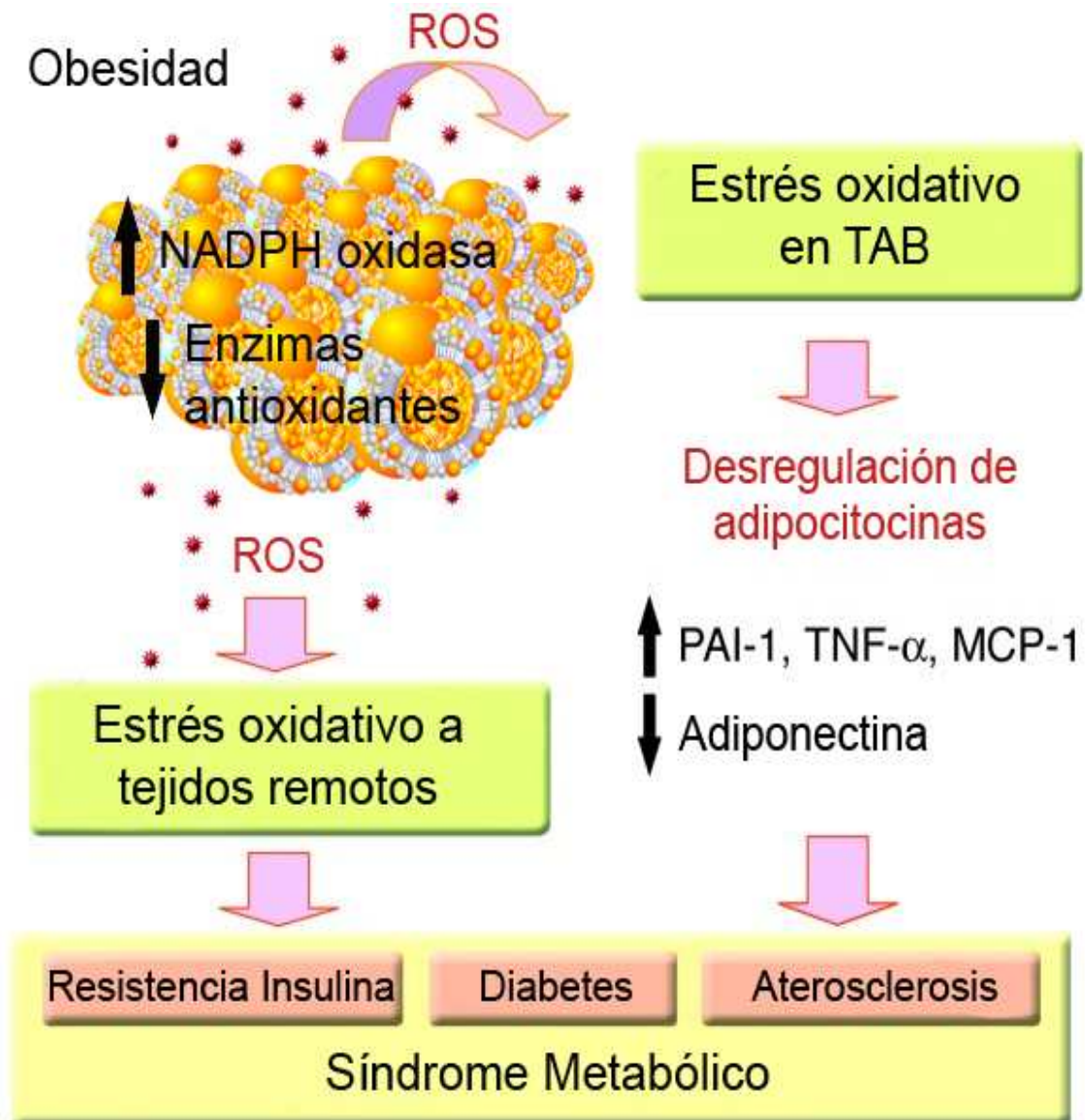


Figura 4. El incremento en la producción de ROS desde el depósito de grasa en la obesidad puede contribuir al desarrollo del síndrome metabólico. ROS: especies reactivas de oxígeno, TAB: tejido adiposo blanco, PAI-1: Inhibidor del plasminógeno-1, TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa.

2.2. **E**steatosis hepática no alcohólica (NAFLD)

El hígado es responsable de la coordinación del metabolismo intermedio. Los Hepatocitos son activamente involucrados en el metabolismo de la glucosa y los lípidos (incluyendo colesterol y lipoproteínas), síntesis de proteínas plasmáticas y la producción de proteínas inflamatorias tales como la proteína C reactiva (PCR); por tanto es fácil suponer que una alteración del metabolismo hepático tenga consecuencias graves en el resto del organismo. La obesidad está asociada con esteatosis, una acumulación patológica de lípidos dentro de los hepatocitos. La enfermedad del hígado graso no asociada al consumo de alcohol (NAFLD) es la forma más común de enfermedad hepática crónica y es caracterizada por un exceso en la acumulación de lípidos y resistencia a la insulina hepática (**Figura 5**). En un estado tardío de la enfermedad esta puede progresar a inflamación hepática convirtiéndose en esteatohepatitis (NASH) y culminar con fibrosis o cirrosis (**Figura 6**).

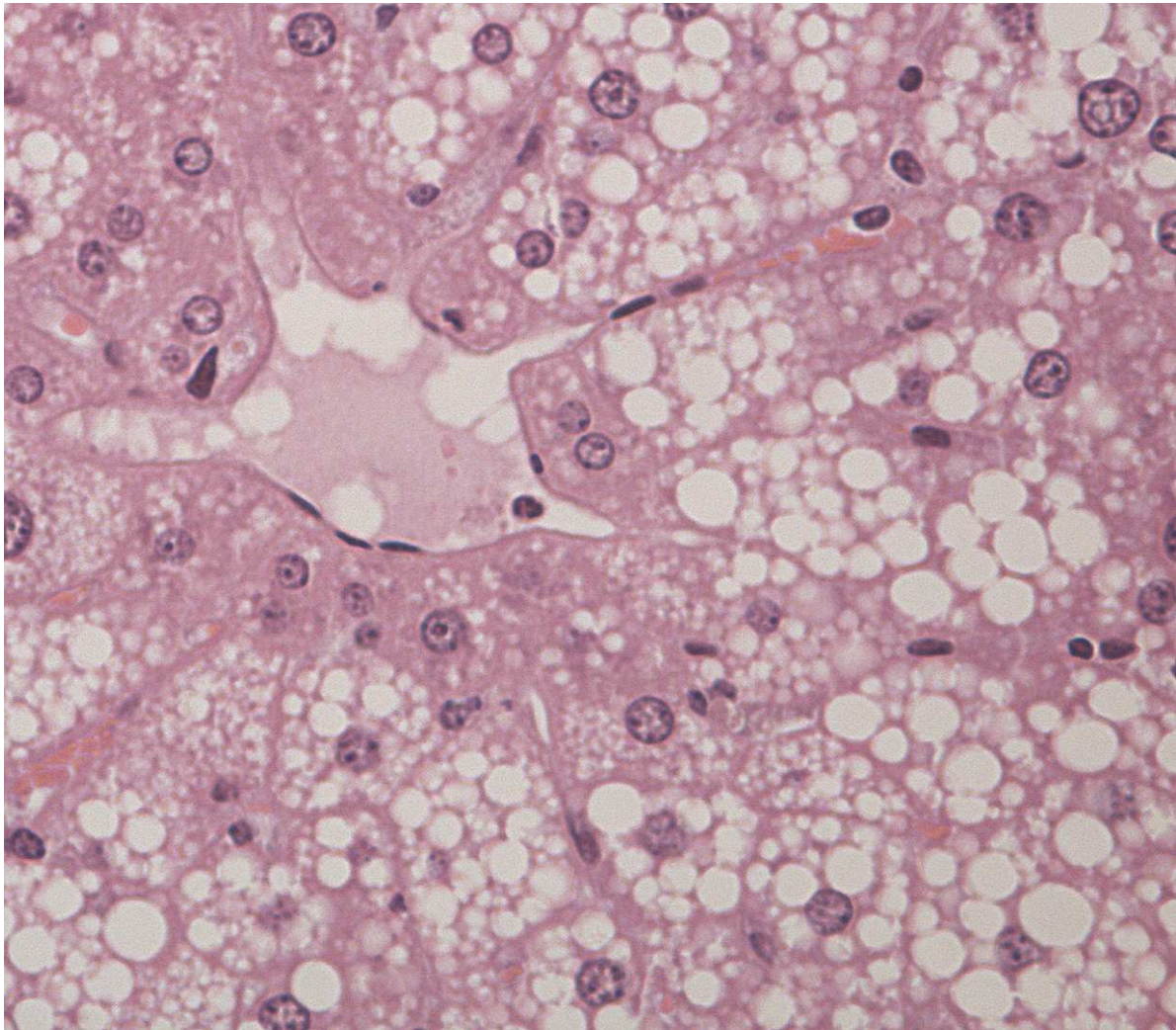


Figura 5. Hígado graso: el citoplasma de los hepatocitos es ocupado por vacuolas grasas que en condiciones extremas afectarán el metabolismo celular. Esta condición puede evolucionar a esteatohepatitis, cirrosis y en



Figura 6. Hígado humano: De izquierda a derecha: hígado sano, hígado graso e hígado cirrótico.

En la obesidad, citocinas inflamatorias ($IL-1\beta$, $TNF\alpha$ y $IL-6$) y adiponectinas liberadas del tejido adiposo visceral consiguen el hígado a través de la vena portal y pueden directamente interferir con las funciones hepáticas. En un estado inflamatorio, $TNF\alpha$ puede inducir apoptosis del hepatocito y la activación de la respuesta fibrogénica, mientras $IL-6$ está implicada en la inducción de la respuesta de fase

aguda por aumento de la PCR. A diferencia de las citocinas, la adiponectina tiene efectos protectores en el hígado. Administración de adiponectina mejora la esteatosis, probablemente por inhibición de la vía de señalización del $\text{TNF}\alpha$. Además la adiponectina tiene efectos antifibrogénicos: ratones KO para adiponectina expuestos al CCL4 desarrollan una fibrosis más severa que los animales normales.

Sin embargo, la fuente más importante de citocinas inflamatorias dentro del hígado son las células de kupffer, los macrófagos residentes en el hígado. Durante la esteatosis, el reclutamiento de nuevos macrófagos dentro del hígado puede alterar la distribución celular y por lo tanto cambiar la morfología y la función de las células de kupffer. En efecto, en el hígado de pacientes con NASH, células grandes de kupffer se ubican alrededor de las venas mientras que en la esteatosis su distribución es más difusa. Hay evidencia de que la respuesta inmune de las Th1 domina en la NAFLD, promoviendo la activación clásica a macrófagos M1 de las células de kupffer. Recientes estudios en roedores sugieren un papel directo para la activación M1 de la célula de kupffer en el metabolismo de los ácidos grasos y la esteatosis. Interesantemente, células de kupffer de ratas alimentadas con dietas ricas en grasa producen altos niveles de NO y el $\text{TNF}\alpha$ derivado de la activación por citocinas de los M1. Por otra parte, la depleción de las células de kupffer, previene la esteatosis y el desarrollo de resistencia a

la insulina. En ratones, una disminución de las células de kupffer está asociada con disminución de triglicéridos hepáticos e incremento en la expresión de genes involucrados en la oxidación de ácidos grasos, tales como el PPAR α (11). La habilidad de los PPAR y de los LXRs para reducir la producción de citocinas en monocitos/macrófagos inflamatorios activados se ha demostrado. Sin embargo, el efecto de agonistas de los receptores nucleares sobre las células de kupffer activadas no está claro. Algunos estudios, muestran que la pioglitazona un ligando del PPAR α disponible para uso clínico, previene el daño hepático inducido por endotoxinas por un mecanismo dependiente de la supresión del TNF α y producción de NO por las células de Kupffer (12). En el hígado de ratón la activación del PPAR α está asociada con la producción de las especies reactivas del oxígeno y cáncer mediadas por las células de kupffer. Casos reportados indican que el uso terapéutico de ligandos del PPAR α puede conducir a fibrosis hepática. Contrario a esas observaciones, se ha demostrado que aumentos en PPAR α mejoran la esteatosis hepática inducida experimentalmente en ratas (13). Por otra parte, se ha demostrado que PPAR α y PPAR β/δ son participantes activos en el gasto de la energía, mientras el PPAR γ el cual tiene dos isoformas, PPAR γ 1 y PPAR γ 2, es crítico en la regulación de la diferenciación del adipocito y en el almacenamiento de energía en esta célula. PPAR γ puede inducir acumulación de lípidos cuando es

sobre-expresado en células como el hepatocito. En resumen, PPAR γ regula el anabolismo lipídico, mientras que PPAR α y PPAR β/δ funcionan como reguladores catabólicos de energía (14,15).

2.3. Modelos animales

Debido a la evidente dificultad que implica estudiar los mecanismos patogénicos que hacen al humano candidato a sufrir obesidad y el síndrome metabólico, el empleo de modelos animales ha permitido una aproximación al conocimiento de las secuencias de acontecimientos y los mecanismos responsables de la aparición de la enfermedad.

Claramente los modelos murinos empleados para el estudio de los trastornos metabólicos difieren en algunos aspectos con la enfermedad presentada en humanos. Factores de riesgo/indicadores como por ejemplo la circunferencia de la región abdominal no pueden ser trasladados del humano al ratón. Entonces, no solo un tipo de modelo genético puede mimetizar todos los aspectos del síndrome metabólico en humanos, de forma que para el estudio actual del SM se deban utilizar varios modelos genéticos cada uno de ellos reflejando uno o dos aspectos de la enfermedad en humanos. Esto ya es un inconveniente

puesto que eleva los costes y complica el análisis de resultados de los estudios realizados en estos modelos animales.

2.3.1. **M**odelos de obesidad y resistencia a la insulina

A través del uso de modelos murinos se puede investigar la patofisiología por la cual la obesidad conduce al desarrollo de resistencia a la insulina. Similar a los humanos, aumentos de grasa abdominal y resistencia a la insulina se han demostrado en ratones (16). Los modelos animales más utilizados para estudiar la obesidad son el ratón deficiente en Leptina ($Lep^{ob/ob}$) y el deficiente en el receptor de la leptina ($LepR^{db/db}$). Aunque todos los deficientes en el gen de la leptina sobre cualquier “background” tienen hiperfagia, su hiperglicemia cambia de acuerdo a los antecedentes genéticos del ratón sobre el que se haga la mutación; por ejemplo los deficientes en el gen de la leptina hecho en la cepa C57BL/6J presentan menos hiperglicemia que los hechos en la cepa C57BL/KsJ el cual presenta glicemias de más de 25mmo/L acompañados de fallo de las células β (17,18).

2.3.2. Modelos de hiperlipidemia

La obesidad visceral y resistencia a la insulina se correlacionan fuertemente con el desarrollo de alteraciones en el metabolismo de los lípidos. Con el desarrollo de técnicas de manipulación génica, ha sido posible generar ratones deficientes en genes que se conoce influyen el metabolismo de las lipoproteínas. La mayoría de modelos murinos son hiperlipidémicos (VLDL y LDL elevadas) más que dislipidémicos (triglicéridos elevados y HDL reducidas); sin embargo ellos son muy útiles para el estudio de trastornos metabólicos. Dos modelos animales que pertenecen a este grupo son los ratones deficientes en el receptor de las lipoproteínas de baja densidad (LDLr^{-/-}) y los ratones deficientes en la apolipoproteína E (ApoE^{-/-}) (19).

2.3.2.1. Ratón deficiente en el gen de la apolipoproteína E (APOE^{-/-})

Uno de los ratones creado por manipulación genética es el deficiente en la apolipoproteína E (ApoE), una glicoproteína de aproximadamente 34 KDa sintetizada principalmente en el hígado y el cerebro de humanos y animales. Forma parte de todas las lipoproteínas excepto de

las LDL. Es un ligando para receptores que se encargan de internalizar quilomicrones y remanentes de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) permitiendo la captación específica por las células hepáticas de partículas que contengan ApoE. La ApoE humana es una proteína polimórfica y consiste de 3 isoproteínas (ApoE 2,3 y 4). Los tres alelos están asociados con variaciones de la concentración plasmática del colesterol contenido en las LDL. Existe una forma mutada de la ApoE (ApoE3 Leiden), que predispone al humano a padecer la enfermedad conocida como apolipoproteinemia tipo III, caracterizada por concentraciones elevadas de colesterol y triglicéridos en el plasma, por la presencia de xantomas y el desarrollo de aterosclerosis a una edad prematura.

La deficiencia de esta proteína en ratones transgénicos los convierten en susceptibles al desarrollo de aterosclerosis inducida por dieta y presentan una gran similitud en los síntomas con los pacientes que sufren de apolipoproteinemia tipo III. Pueden llegar a tener valores de 20 mmol/L de colesterol plasmático con incremento en la concentración de VLDL y disminución en HDL lo que los conduce a presentar aterosclerosis espontánea cuando son alimentados con dietas normales (bajas en grasa y colesterol) (20-23).

2.3.2.2. **R**atón deficiente en el receptor de las LDL (LDLR^{-/-})

Los receptores de LDL de la superficie celular reconocen la apolipoproteína B (apo B) en las LDL y también a la ApoE de las lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) y a través de un proceso de unión de elevada afinidad se internalizan sacando estas lipoproteínas de la circulación. La deficiencia del receptor de las LDL causa hipercolesterolemia pronunciada con complicaciones cardiovasculares en humanos.

Ratones deficientes en este receptor fueron creados también por manipulación de genes de células embrionarias. Estos ratones presentan un perfil lipídico caracterizado por un incremento de colesterol contenido en las fracciones lipoproteicas de las IDL y las LDL que tiene como resultado una concentración plasmática de colesterol de hasta 15 mmol/L cuando estos animales son alimentados con una dieta normal (24). Los ratones LDLR^{-/-} bajo estas condiciones no desarrollan aterosclerosis, pero responden a la dietas ricas en grasa y colesterol que les ocasiona abundantes lesiones ateroscleróticas e incrementos en el colesterol plasmático hasta de 40mmol/L.

Además cuando este modelo animal se alimenta con dietas que contengan más de 20% de grasa se vuelven obesos y resistentes a la insulina (25). Este modelo animal resulta muy útil cuando se quiera estudiar la obesidad inducida por dieta y la resistencia a la insulina en presencia de hiperlipidemia.

2.4. Quimiocinas

Las quimiocinas (citocinas quimiotácticas) son pequeñas proteínas (60-100 aminoácidos), las cuales constituyen una gran familia de péptidos estructuralmente relacionados con las citocinas cuya principal función es la regulación del tráfico celular. Identificadas por primera vez en 1977 con la purificación del factor 4 plaquetario (26) Se han identificado desde entonces, más de cincuenta quimiocinas humanas y veinte receptores de ellas (27). Pueden ser clasificadas en cuatro familias basadas en el número y localización de los residuos de cisteína en la región N-terminal de la molécula y son nombrados como C, C-C, C-X-C, y C-X-X-X-C, de acuerdo con la nomenclatura sistemática (28). Los genes para las quimiocinas C-X-C se ubican todos muy cerca, en el cromosoma 4, mientras que los miembros de las quimiocinas C-C son codificados por genes localizados en el cromosoma 17 (29).

2.4.1. **P**roteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1)

MCP-1, llamada así por la función que desempeña al atraer monocitos, también conocida como CCL2 por la nomenclatura sistemática, está compuesta por 76 aminoácidos y tiene un tamaño de 13 KDa. MCP-1 es producida por una gran variedad de células, su expresión puede ser constitutiva o ser inducida por estrés oxidativo. Se han identificado dos regiones en la estructura primaria que son críticas para la función biológica de esta proteína. La primera, está formada por las tirosinas 10 y 13, mientras la segunda también funcionalmente importante formada por los residuos de serina 34 y lisina 35. Cuando son alteradas por análisis mutacionales, la estructura primaria se cambia drásticamente y esto tiene como consecuencia la pérdida de su función biológica (30).

La MCP-1 es producida por células: endoteliales, fibroblastos, epiteliales, células del músculo liso, células mesangiales, astrocitos, células monocíticas y microgliales (31). Estas células son importantes en la respuesta inmune anti viral en la circulación periférica y en los tejidos. Sin embargo, son los monocitos/macrófagos la mayor fuente de MCP-1 (32-34). Esta molécula ha sido mostrada como un punto potencial de intervención para algunas enfermedades como esclerosis

múltiple, artritis reumatoide, síndrome metabólico, aterosclerosis y diabetes tipo 2 (35); y ha sido propuesta como un posible marcador de aterosclerosis aunque en este aspecto no hay unanimidad de criterios en la comunidad científica (36,37).

Ratones genéticamente modificados, proveen evidencia del papel de la MCP-1 en aterosclerosis. Ratones deficientes en MCP-1 sobre un background LDLr^{-/-} alimentados con una dieta rica en grasa y colesterol tienen menos acumulación de lípidos en el arco aórtico que su control LDLr^{-/-}. Por el contrario, la pared arterial de conejos hipercolesterolémicos que sobre expresan MCP-1 aumentan la velocidad con la que se infiltran los monocitos y por tanto aceleran la progresión de la aterosclerosis.

La MCP-1 también tiene un papel relevante en la obesidad y la diabetes. Concentraciones altas de esta molécula en plasma están asociadas con obesidad en animales y humanos. Ratones transgénicos con una sobreexpresión de MCP-1 en el tejido adiposo presentan mayor infiltración de macrófagos, incremento en los triglicéridos hepáticos y resistencia a la insulina. Por el contrario, ratones MCP-1^{-/-} alimentados con dietas ricas en grasa presentan una disminución drástica en la acumulación de macrófagos en el tejido adiposo y una disminución de la esteatosis hepática cuando se compararon con ratones MCP-1^{+/+} alimentados con la misma dieta. Así, estos resultados sugieren que la

expresión de MCP-1 en el tejido adiposo está relacionada con la infiltración de macrófagos dentro del tejido adiposo, resistencia a la insulina y esteatosis hepática asociada a la obesidad del ratón (38).

El papel de MCP-1 en la diabetes inducida por obesidad es mediado por su unión al receptor CCR2. Ratones obesos deficientes en este receptor, presentaron una infiltración reducida de macrófagos, un incremento de la expresión de adiponectina, una disminución de la esteatosis hepática y una disminución de la IR. Es importante entonces el papel cumplido por MCP-1 y su receptor CCR2, sin embargo, ya que más MCPs pueden unirse a CCR2 los resultados obtenidos con ratones MCP-1 deficientes no serán los mismos que los obtenidos con los ratones deficientes de CCR2.

Varios estudios demuestran que el papel de MCP-1 no solo es atraer monocitos hacia la pared arterial (38-41). Trabajos recientes de Zhou *et al.* (42), han demostrado que la unión de MCP-1 a CCR2 aumenta la expresión de MCP-1 (proteína inducida por MCP-1) que es un factor de transcripción que inicialmente se asoció al aumento de muerte celular. Evidencias experimentales muestran que MCP-1 induce la apoptosis aumentando la producción de especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno (ROS y RNS) vía la inducción de NADPH oxidasa y la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS). Estas moléculas causan

estrés del retículo endoplasmático que conduce a autofagia y muerte celular (43).

2.4.2. **P**roteína quimioatrayente de monocitos 2 (MCP-2)

Esta proteína menos estudiada que la MCP-1, ha sido caracterizada como una molécula quimio táctica para células como: monocitos, células T, células NK y basófilos. La potencia de atracción ejercida sobre los monocitos es similar a la presentada por MCP-1 y se une con la misma afinidad al receptor CCR2A lo que implica que las vías metabólicas reguladas por estas dos proteínas cuando se unen al mismo receptor sean iguales. En estudios realizados en humanos obesos comparados con individuos de peso normal se ha encontrado que MCP-1, y MCP-3 se encuentran aumentadas mientras que MCP-2 tiene una expresión baja no solo en tejido adiposo subcutáneo y visceral sino además en células como los adipocitos (44).

2.4.3. **P**roteína quimioatrayente de monocitos 3 (MCP-3)

De los miembros de las MCPs, es la proteína con más amplio rango de acción pues además de ejercer la quimiotaxis sobre monocitos, células T, células NK y basófilos, también lo hace sobre eosinófilos y células dendríticas. Estudios *in vitro*, han demostrado que MCP-1 y MCP-3 se encuentran aumentadas en astrocitos y que su mecanismo de acción implica activación del TNF α con inducción posterior de vías metabólicas donde participan tanto el NF- κ B como la MAPK. Los autores de estos experimentos demostraron también que ante el mismo estímulo la producción de MCP-1 es 10 veces mayor que la de MCP-3. La citoquina proinflamatoria TNF α esta incrementada en varias enfermedades neurodegenerativas y en enfermedades inflamatorias del SNC y una gran variedad de estímulos pueden incrementar su concentración en células como los astrositos; por esa razón ha crecido el interés en el estudio del papel cumplido por las MCPs en el SNC (44,45).

2.4.4. **P**roteína quimioatrayente de monocitos 5 (MCP-5)

MCP-5 es una quimioquina solo expresada en ratón y es la más parecida a MCP-1 humana con un 66% de aminoácidos comunes para ambas proteínas. En estudios realizados en ratones ApoE^{-/-} se ha encontrado que en estadios tempranos en la formación de la placa aterosclerótica los genes correspondientes a MCP-1 y MCP-5 junto a la de su receptor CCR-2 aumentan su expresión sugiriendo que estas proteínas cumplen un papel importante en la formación de la placa aterosclerótica. Recientemente Rull A. *et al.* (46), trabajando con aortas de dos cepas de ratones LDLr^{-/-} y MCP-1^{-/-}LDLr^{-/-} han demostrado que la expresión de los genes correspondientes a MCP-1 y MCP-5 se autorregulan, es decir, que en los ratones LDLr^{-/-} hay una mayor expresión del gen de MCP-1 y una menor expresión del gen de MCP-5; mientras que en los ratones MCP-1^{-/-} LDLr^{-/-} es el gen de la MCP-5 el que aumenta su expresión sugiriendo que cuando no hay MCP-1, la MCP-5 es quien la reemplaza en su función quimioatrayente de monocitos. Estos resultados son coherentes con otros que afirman que en ratones MCP-1^{-/-} la placa aterosclerótica no se disminuye en la forma esperada debido a que otras citocinas podrían reemplazar la acción de esta proteína (47,48).

2.5. CCR2

Muchos de los receptores de las proteínas C-C están formados por cerca a 350 aminoácidos y sus genes están ubicados muy cerca en el cromosoma 3p21-22 (49). Todos los receptores de quimiocinas identificados son receptores acoplados a la proteína G. La mayoría de los receptores de quimiocinas C-C que se unen a una o más MCPs son compartidos con otras quimiocinas C-C. Todas las MCPs humanas se unen al menos a dos receptores. Sin embargo a pesar de esa redundancia cada quimioquina tiene una única y específica función (50). MCP-1 media su efecto a través de CCR-2, y su expresión está restringida a ciertos tipos de células. Las dos formas de este receptor se generan por *splicing* alternativo: CCR-2A y CCR-2B las cuales difieren en su grupo terminal carboxilo (51). CCR-2A es la isoforma más expresada por células mononucleares y células del músculo liso vascular (52), mientras que monocitos y células *natural killer* activadas expresan predominantemente la isoforma CCR-2B. Es posible que CCR-2A y CCR-2B puedan activar diferentes vías de señalización y produzcan diferentes efectos metabólicos. Por ejemplo, la quimiotaxis producida por MCP-1 sobre células CCR-2A positivas ocurre sin movilización de Ca^{2+} , pero la movilización del flujo de Ca^{2+} es inducido

por células CCR-2B positivas. Ha sido descrito que MCP-1 es capaz de incrementar la expresión de CCR-2A pero no la de CCR-2B en pacientes con artritis reumatoide (53). Es importante resaltar que CCR-2 tiene ambas acciones: proinflamatoria y anti-inflamatoria. Weisberg *et al.* (54), utilizaron ratones deficientes en CCR-2 y los alimentaron con dietas ricas en grasa y colesterol. Sus conclusiones sugieren que CCR2 puede regular efectos metabólicos e inflamatorios.

2.6. Las Paraoxonasas (PON)

La familia de las paraoxonasas están conformadas por tres miembros: PON1, PON2 y PON3. En el ser humano, los genes se encuentran localizados en el cromosoma 7 y en ratones en el cromosoma 6. Lo que se conoce hasta el momento es que en los seres humanos PON1 y PON3 se expresan principalmente en hígado y riñón mientras que la PON2 se considera ubicua, es decir, que es expresada en casi todos los órganos (55,56). El nombre de paraoxonasa proviene de su capacidad para hidrolizar un metabolito tóxico del insecticida paratión, el paraoxón (actividad paraoxonasa), aunque también tiene la capacidad de hidrolizar esteroides aromáticos como hace con el fenilacetato (actividad arilesterasa) (57,58). En la década de los 90 se le va a atribuir otra

función, la de prevenir la acumulación de lipoperóxidos en las LDL (59). También se ha probado que puede hidrolizar lactonas y tiolactonas de homocisteína y que está involucrada en la protección contra toxicidad de xenobióticos (60-62).

2.6.1. **P**araoxonasa 1 (PON1)

En estudios realizados en modelos animales se ha demostrado la función antioxidante de la PON1. En especial, los realizados utilizando el ratón knockout (KO) para PON1 (PON1^{-/-}) y el ratón transgénico para PON1 humana (hPON1Tg) (63). El ratón doble KO para el gen de la PON1 y para el gen de la apolipoproteína E (apoE), PON1^{-/-} ApoE^{-/-} presentó un aumento en la oxidación lipídica y un aumento del tamaño de la lesión aterosclerótica comparada con la que presentaron los ratones ApoE^{-/-} (64). Además, las HDL aisladas del ratón PON1^{-/-} no pueden prevenir la oxidación de las LDL *in vitro*. Por otra parte, la sobreexpresión de PON1 humana en un ratón inhibe la formación de peróxidos lipídicos en las HDLs y protege la estructura y función de las LDL (65,66).

Además se ha demostrado *in vitro* que las HDL pueden atenuar la estimulación de la migración de monocitos inducida por la LDL oxidada

(67) y que las HDL pueden suprimir la producción de MCP-1. PON1 actúa como una enzima antioxidante, de manera que puede ser que participe como una enzima antiinflamatoria de la HDL. Mackness *et al.* (68) fueron los primeros en demostrar que PON1 podía inhibir la producción de MCP-1 en células endoteliales incubadas con LDL oxidadas. Estos autores encontraron que tanto las HDL como la PON1 recombinante bloquean la producción de MCP1, mientras que HDL de origen aviar (la cual a diferencia de la humana no tiene PON1) no tiene esta capacidad. Parece ser que esta inhibición de MCP-1 por parte de la PON1 es debida a su capacidad para inhibir la oxidación de las LDL.

Los estudios con animales de experimentación han demostrado esta función antiinflamatoria de la PON1. Ratones hPON1Tg alimentados con dietas proaterogénicas, han demostrado que desarrollan menos lesiones ateroscleróticas, menos estrés oxidativo y tienen menos expresión de MCP-1 en las aortas comparado con los mismos ratones sin modificaciones genéticas. Se han obtenido resultados similares en modelos experimentales de ratones con obesidad y síndrome metabólico en los que se sobre expresa PON1 humana.

Estudios posteriores han mostrado que esta función antioxidante y antiinflamatoria de PON1 es compleja e involucra no solo inhibición de la peroxidación sino también un aumento en el eflujo de colesterol de los macrófagos vía HDL.

2.6.2. **P**araoxonasa 2 (PON2)

La PON2 es una proteína de 44 kDa que, como ya se ha descrito anteriormente, no se encuentra en las lipoproteínas, sino que tiene una expresión intracelular que se considera ubicua. Aun no se sabe el papel fisiológico de esta enzima. Se ha visto que PON2 también es capaz de hidrolizar lactonas, pero no paraoxón u otros xenobióticos. Además, se ha demostrado *in vitro* su capacidad de retardar la oxidación de las LDL.

2.6.3. **P**araoxonasa 3 (PON3)

PON3 es la más recientemente identificada y puede ser la menos caracterizada. Es una proteína de aproximadamente 44 kDa que, al igual que la PON1, se encuentra unida a las HDL pero en concentraciones más bajas (69). PON3 también comparte la característica de hidrolizar lactonas e impedir la oxidación de las LDL *in vitro* pero al igual que la PON2 tampoco hidroliza paraoxón u otros xenobióticos (69, 70).

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTEATOSIS DE ORIGEN DIETÉTICO: ¿LA INFLAMACIÓN Y LA OXIDACIÓN ACTÚAN DE FORMA COORDINADA?

Fernando Rodríguez Sanabria

ISBN:978-84-694-0296-2/T-203-2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTEATOSIS DE ORIGEN DIETÉTICO: ¿LA INFLAMACIÓN Y LA OXIDACIÓN ACTÚAN DE FORMA COORDINADA?

Fernando Rodríguez Sanabria

ISBN:978-84-694-0296-2/T-203-2011

3. **H**ipótesis

En la obesidad y en la alteración hepática más común relacionada con esta, como es la **esteatosis hepática**, intervienen tanto factores genéticos como ambientales. En estudios anteriores con modelos animales¹, ya hemos observado que el efecto de una dieta rica en grasas y colesterol está implicado en el desarrollo de complicaciones metabólicas, y que varían en función de la carga genética animal. De entre los órganos con funciones metabólicas importantes destaca el hígado, por ser el encargado de infinidad de funciones bioquímicas necesarias para mantener el equilibrio homeostático de todo el organismo. Hemos observado² que los trastornos en la síntesis, transporte o eliminación de ácidos de cadena larga del hígado se relacionan con el desarrollo de la esteatosis hepática y la esteatohepatitis posterior.

Por tanto,

“El hígado de ratones ApoE^{-/-} y LDLr^{-/-} presentan una respuesta metabólica diferente ante un estímulo nutricional”

Aunque la esteatosis hepática está considerada una enfermedad relativamente benigna, la progresión a esteatohepatitis es un paso crítico con consecuencias graves, que incluyen fibrosis, cirrosis y cáncer. Por ello, no es de extrañar que la presencia de inflamación esté asociada con la pérdida del equilibrio inmune en todas las alteraciones

metabólicas anteriormente descritas, y en las que las citocinas desarrollan un papel crucial. Concretamente, ya hemos avanzado³ que tanto la inflamación como la oxidación intervienen en la esteatosis hepática, de forma que un incremento de radicales libres desencadena una respuesta inflamatoria que a su vez fuerza la creación de más radicales libres con la consiguiente respuesta inflamatoria que este efecto supone, y por tanto creándose un círculo vicioso que probablemente interviene en muchas enfermedades.

Por lo tanto proponemos que,

“La regulación de la oxidación y la inflamación que involucra a paraoxonasas y quimiocinas son procesos que suceden en todo el organismo del ratón.”

¹ Joven J , Rull A, Ferre N, Escola-Gil JC, Marsillach J, Coll B, Alonso-Villaverde C, Aragonés G, Claria J, Camps J. The results in rodent models of atherosclerosis are not interchangeable. The influence of diet and strain. *Atherosclerosis*. 2007; 198:e85-92

² Vinaixa M, Ángel Rodríguez M, Rull A, Beltrán R, Bladé C, Brezmes J, Cañellas N, Joven J, Correig X. Metabolomic Assessment of the Effect of Dietary Cholesterol in the Progressive Development of Fatty Liver Disease. *J Proteome Res*. 2010; 9:2527-38

³ Camps J, Marsillach J, Rull A, Alonso-Villaverde C, Joven J. Interrelationships between paraoxonase-1 and monocyte chemoattractant protein-1 in the regulation of hepatic inflammation *Adv Exp Med Biol*. 2010; 660:5-18

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTEATOSIS DE ORIGEN DIETÉTICO: ¿LA INFLAMACIÓN Y LA OXIDACIÓN ACTÚAN DE FORMA COORDINADA?

Fernando Rodríguez Sanabria

ISBN:978-84-694-0296-2/T-203-2011

4. **O**bjetivos

4.1. Evaluar la respuesta inflamatoria a una dieta rica en grasa y colesterol en dos modelos animales con diferente carga genética y defecto metabólico.

4.2. Estudiar si la expresión proteica y genética de las paraoxonasas y las quimiocinas está presente en todos los tejidos del ratón.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTEATOSIS DE ORIGEN DIETÉTICO: ¿LA INFLAMACIÓN Y LA OXIDACIÓN ACTÚAN DE FORMA COORDINADA?

Fernando Rodríguez Sanabria

ISBN:978-84-694-0296-2/T-203-2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTEATOSIS DE ORIGEN DIETÉTICO: ¿LA INFLAMACIÓN Y LA OXIDACIÓN ACTÚAN DE FORMA COORDINADA?

Fernando Rodríguez Sanabria

ISBN:978-84-694-0296-2/T-203-2011

5. **M**ateriales y métodos

5.1. Estudio 1

5.1.1. Diseño del estudio

Para el estudio se utilizaron ratones macho LDLR^{-/-} y ApoE^{-/-} (n = 24 por cada cepa) con background C57BL/6J, criados en nuestro estabulario a partir de cepas obtenidas en el laboratorio especializado Jackson (California, USA). Para determinadas comparaciones se utilizaron como control ratones C57BL/6J. Los animales fueron estabulados en condiciones estándar (22°C y ciclos de luz/oscuridad de 12/12 horas), recibiendo una dieta comercial de mantenimiento (Harlan, Barcelona, España) y agua ad libitum. Los animales fueron alimentados con dieta de mantenimiento (14% de proteínas, 3% de grasa y 0.03% de colesterol) hasta las 10 semanas de edad, momento en que los animales fueron distribuidos en los distintos grupos de estudio (n= 8 por grupo). Los primeros grupos de estudio, uno por cepa, se sacrificaron a las 10 semanas de edad, y las variables analizadas sirvieron como valores base de cada cepa estudiada. El resto de animales de cada cepa fue asignado a dos grupos dietarios. El grupo 1 siguió con la dieta normal de mantenimiento y el grupo 2 recibió una dieta rica en grasas y colesterol (dieta normal suplementada con 20% de grasa de aceite de

palma y 0.25% de colesterol). Cuando los ratones alcanzaron las 16 semanas de edad fueron sacrificados (en ayuno mínimo de 12 horas) con previa anestesia (solución de Ketamina/Xilacina), la sangre extraída mediante punción cardiaca, e inmediatamente los órganos perfundidos con solución salina fisiológica. Los órganos de interés fueron extraídos y divididos en dos partes: una porción fue sumergida en una solución de formol al 10% durante 24 horas y fijado en parafina para posteriores análisis inmunohistológicos, y otra porción fue inmediatamente congelada en nitrógeno líquido y luego almacenada a -80°C hasta su posterior análisis.

5.1.2. **D**eterminaciones bioquímicas

La sangre fue recogida en tubos tratados con solución EDTA, y centrifugada para la correcta obtención del plasma. Se determinó la concentración plasmática de glucosa, colesterol y triglicéridos, así como las actividades enzimáticas alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) por medio de procedimientos estándares de laboratorio, en un analizador automático (Synchron Lxi, Beckman-Coulter, Izasa, España). La concentración plasmática de insulina fue

determinada mediante un kit comercial por técnica de radioinmunoensayo (Linco, St. Charles, MO).

5.1.3. **P** prueba de tolerancia a la glucosa

Una semana antes del sacrificio, 5 animales de cada grupo fueron sometidos a una prueba de tolerancia a la glucosa. Después de 12 horas de ayuno, se determinó la concentración basal de glucosa en los animales utilizando las tiras de glucosa adaptadas al sistema sensor Accucheck (Roche Diagnostics), y seguidamente se les administró una solución de glucosa (2 mg/g de peso) mediante punción intraperitoneal. Se volvió a determinar la concentración de glucosa en sangre a los 15, 30, 60 y 120 minutos posteriores a la inyección.

5.1.4. **C** Concentración de colesterol y triglicéridos hepáticos

Para determinar la cantidad de colesterol y triglicéridos presentes en el hígado de estos animales, se homogenizaron, con la ayuda del homogenizador precellys 24 (Berlin technologies, Montigny-le-

bretonneux, Francia), 50 mg de tejido hepático en 5 ml de una mezcla de hexano:isopropanol (3:2). Después de Centrifugar, se recoge el sobrenadante y se deja evaporar durante 24 horas. El precipitado se resuspende en

una solución de colato de sodio al 0.5%, para posteriormente cuantificar la cantidad de triglicéridos y colesterol mediante procedimientos estándares de laboratorio en un analizador automático (Synchron Lxi, Beckman-Coulter, Izasa, España).

5.1.5. **E**valuación histológica de la lesión aterosclerótica y el tejido hepático

La evaluación de la lesión arteriosclerótica se realizó en los corazones y parte de aorta ascendente de ratones ApoE^{-/-} y LDLr^{-/-} de 16 semanas de edad. En el momento del sacrificio los corazones fueron sumergidos en OCT e inmediatamente congelados para la posterior realización de cortes transversales, usando las válvulas aórticas como punto de referencia anatómica para la evaluación de la lesión arteriosclerótica (71). La evaluación morfológica del hígado, en cuanto a la presencia de esteatosis hepática como de inflamación, se realizó por medio de la tinción de hematoxilina y eosina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Para la evaluación histológica de los lípidos hepáticos se usó la tinción

de *Oil Red O* (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) en muestras de tejido fresco (no parafinado).

La infiltración de células inflamatorias en ambos tejidos fue explorada mediante técnicas inmuohistoquímicas. La proporción de macrófagos en la aorta fue determinada en fresco usando el anticuerpo primario Rat anti-mouse MOMA-2 (Serotec, Oxford UK; dilución 1:1000), y en el tejido hepático parafinado el anticuerpo primario Rat anti-F4/80 (Serotec, Oxford UK; dilución 1:6000). En ambos casos se usó el anticuerpo secundario biotinilado goat anti-rat IgG (H+L) (Vector BA-9400; dilución 1:200), el sistema de detección basado en el complejo enzimático estreptavidinia-biotina (Vectastain ABC kit Standard; Vector, PK-4000) y el revelado del producto de reacción mediante el sustrato 3,3´diaminobencidina (DAB, Dako, K3466).

5.1.6. **E**xpresión génica

La extracción del RNA se realizó con la ayuda del ABI PRISM 6100 (Applied Biosystems, Foster City, USA) a partir de tejido congelado (46). Tanto los primers *TaqMan* como las sondas, usadas en los ensayos de amplificación por PCR con el sistema de PCR en tiempo real 7900HT, fueron obtenidos de productos validados en *Assays-on-Demand* (Applied Biosystems) para amplificaciones de PCR. Los ciclos de detección fluorescente se realizaron en un termociclador ABI Prism

7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). Los análisis de los valores de expresión génica se realizaron mediante la valoración de $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Los genes explorados aparecen en la **Tabla 1**.

Tabla 1

| Gene name | Gene symbol | Accession number | Assay ID |
|--|----------------|------------------|---------------|
| Peroxisome proliferator activated receptor alpha | <i>ppara</i> | NM_011144 | Mm00440939_m1 |
| Peroxisome proliferator activated receptor delta | <i>ppard</i> | NM_011145 | Mm00803186_g1 |
| Peroxisome proliferator activated receptor gamma | <i>pparg</i> | NM_011146 | Mm00440945_m1 |
| Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1 | <i>acat1</i> | NM_026180 | Mm00507463_m1 |
| ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1 | <i>abca1</i> | NM_013454 | Mm00442646_m1 |
| ATP-binding cassette, sub-family G, member 5 | <i>abcg5</i> | NM_011075 | Mm00446249_m1 |
| ATP-binding cassette, sub-family G, member 8 | <i>abcg8</i> | NM_031884 | Mm00445970_m1 |
| Cytochrome P450, family 27, subfamily a, polypeptide 1 | <i>cyp27a1</i> | NM_024264 | Mm00470430_m1 |
| Cytochrome P450, family 7, subfamily a, polypeptide 1 | <i>cyp7a1</i> | NM_007824 | Mm00484152_m1 |
| Lecithin cholesterol acyltransferase | <i>lcat</i> | NM_008490 | Mm00500505_m1 |
| Lysosomal acid lipase 1 | <i>lip1</i> | NM_021460 | Mm00498820_m1 |
| Scavenger receptor class B, member 1 | <i>scarb1</i> | NM_016741 | Mm00450236_m1 |
| Sterol regulatory element binding transcription factor 1 | <i>srebf1</i> | NM_011480 | Mm01138344_m1 |

La medición de los factores de transcripción, de componentes de la familia de las MAPKinasas en homogenados de hígado, se realizó mediante técnica ELISA con un kit comercial especial (TransAM™, Actif Motif, Carlsbad, CA, USA).

5.1.7. **A**nálisis estadístico

Los datos obtenidos en este estudio fueron analizados con el software estadístico SPSS/PC, versión 17.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). Para evaluar las diferencias entre dos o más grupos se utilizó la prueba estadística de comparación de medias ANOVA, y en los casos que se consideró necesario comparar medias entre dos únicos grupos, el test U de Mann-Whitney o el test t de Student. Consideramos diferencias significativas entre grupos cuando el valor obtenido de p era menor a 0,05. Para evaluar los datos obtenidos en el análisis de la expresión de PPARs, y la valoración histológica de inflamación y esteatosis, se usaron pruebas estadísticas de correlación.

5.2. Estudio 2

5.2.1. Diseño del estudio

Para este segundo estudio se utilizaron 3 ratones macho *wild-type* con background C57BL/6J. Los animales fueron estabulados en condiciones estándar (22°C y ciclos de luz/oscuridad de 12/12 horas), recibiendo una dieta comercial de mantenimiento (14% de proteínas, 3% de grasa y 0.03% de colesterol; Harlan, Barcelona, España) y agua *ad libitum* hasta el momento del sacrificio. Los ratones fueron sacrificados a las 10 semanas de edad (en ayuno mínimo de 12 horas), previa anestesia (solución de Ketamina/Xilacina), e inmediatamente los órganos perfundidos con solución salina fisiológica, y divididos en dos partes:

- una porción sumergida en formol al 10% durante 24 horas, y posteriormente fijada en parafina para la realización de análisis inmunohistológicos e inmunohistoquímicos;
- y una segunda porción inmediatamente congelada en nitrógeno líquido y luego almacenada a -80°C para poder posteriormente realizar la extracción de RNA y el análisis de expresión génica.

Se extrajeron los siguientes órganos: aorta, bazo, cartílago, cerebro, corazón, estómago, glándulas sublingual y submandibular, hígado,

hipotálamo, hueso, intestino delgado y grueso, lengua, médula espinal, médula ósea, músculo esquelético, ojo, páncreas, piel, pulmón, riñón, tejido adiposo blanco epididimal e inguinal, tejido adiposo marrón, testículo y timo. De todos ellos se realizaron análisis inmunohistoquímicos y de expresión génica, a excepción de la médula ósea, la piel y el ojo, de los cuales solamente se pudo realizar análisis inmunohistoquímico.

5.2.2. **A**nálisis inmunohistoquímicos

Para los análisis inmunohistoquímicos se usaron cortes de 2 μm de espesor de cada uno de los órganos anteriormente mencionados, siguiendo los protocolos establecidos. Para la detección de las quimioquinas y el receptor CCR2 se usaron anticuerpos comerciales específicos (**Tabla 2**) (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), mientras que para la detección de las paraoxonasas se usaron anticuerpos cedidos por otros investigadores (72). En todos los casos se usó una dilución 1/200 de anticuerpo secundario comercial, biotinilado goat anti-rat IgG (H+L) (Vector BA-9400) para las quimioquinas; y biotinilado goat anti-rabbit IgG (H+L) (Vector BA-1000) para el receptor CCR2 y las paraoxonasas. El sistema de detección se

fundamenta en la formación del complejo enzimático estreptavidina-biotina (Vectastain ABC kit Standard; Vector, PK-4000) y el revelado del producto de reacción mediante el sustrato 3,3´diaminobencidina (DAB, Dako, K3466). Asimismo, para valorar la infiltración de células inflamatorias en los tejidos, se siguió el mismo protocolo anteriormente descrito, utilizando como anticuerpo primario el rat anti-mouse F4/80 (dilución 1:6000), un marcador de macrófagos maduros.

Tabla 2

| Detección anticuerpo primario | Dilución anticuerpo |
|--------------------------------------|----------------------------|
| MCP-1/CCL2 | 1:100 |
| MCP-2/CCL8 | 1: 100 |
| MCP-3/CCL7 | 1:500 |
| MCP-5/CCL12 | 1:500 |
| CCR2 | 1:200 |
| PON1 | 1: 300 |
| PON2 | 1: 30 |
| PON3 | 1: 300 |

5.2.3. **E**xpresión génica

Para la extracción de RNA se siguió el protocolo de trabajo proporcionado por la marca comercial QIAGEN (IZASA, Barcelona, España). La extracción de RNA se realizó a partir de 20mg de tejido

congelado utilizando un método de separación por columna (RNeasy Plus mini kit, QIAGEN) y el equipo QIAcube. La calidad de RNA extraído y el cálculo de su concentración fue determinado con el espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc. Wilmington, DE, USA) utilizando el ratio $OD_{260/280}$. El paso de RNA a cDNA se realizó a partir de 25 nanogramos de RNA total mediante un kit de alta capacidad para la transcripción reversa (Applied Biosystems, Foster City, USA).

Los *primers* específicos para cada gen (**Tabla 3**) (*TaqMan Gene Expression Assays*) y el cDNA de cada tejido fueron colocados en una placa de 96 pozos MicroAmp (Applied BioSystems). Los ciclos térmicos y de detección de la fluorescencia se realizaron en un equipo específico de detección de secuencia, ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems), con el software 2.3 ABI Prism 7900HT SDS. Los parámetros de la PCR fueron: 2 min a 50°C, 10 min a 95°C, 50 ciclos de 15 segundos a 95°C y 60 segundos a 60°C. El valor del ciclo de máximo umbral (Ct, Cycle threshold) se obtuvo fijando el umbral en la fase de amplificación geométrica de la muestra de cDNA. Para cada gen se hicieron curvas estándar. La cantidad de mRNA para cada muestra fue calculada a partir de dichas curvas y expresada como cantidad relativa a la cantidad de mRNA del gen GAPDH, usado para la normalización del resultado de los genes de interés. Para calcular la

cantidad relativa de mRNA se utilizo el método ΔCt . Este es un método que describe el cambio en la expresión de un gen x, relativo a el cambio en expresión de un gen de referencia, que en nuestro caso fue el GAPDH: ($\Delta Ct = Ct_{\text{gen x}} - Ct_{\text{GAPDH}}$).

Tabla 3

| Gene abbreviation | Gene description | TaqMan gene expression assay number | GenBank accession number |
|--------------------|--|-------------------------------------|--------------------------|
| CCL2 | Chemokine (C-C motif) ligand 7 | Mm00441242_m1 | NM_011333.3 |
| CCL7 | Chemokine (C-C motif) ligand 7 | Mm00443113_m1 | NM_013654.3 |
| CCL8 | Chemokine (C-C motif) ligand 8 | Mm01297183_m1 | NM_021443.2 |
| CCL12 | Chemokine (C-C motif) ligand 12 | Mm01617100_m1 | NM_011331.2 |
| CCR2 | Chemokine (C-C motif) receptor 2 | Mm00438270_m1 | NM_009915.2 |
| PON1 | Paraoxonase 1 | Mm00599936_m1 | NM_011134.2 |
| PON2 | Paraoxonase 2 | Mm00447159_m1 | NM_183308.2 |
| PON3 | Paraoxonase 3 | Mm00447161_m1 | NM_173006.1 |
| GAPDH ¹ | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | Mm99999915_g1 | NM_008084.2 |

¹Reference gene

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTEATOSIS DE ORIGEN DIETÉTICO: ¿LA INFLAMACIÓN Y LA OXIDACIÓN ACTÚAN DE FORMA COORDINADA?

Fernando Rodríguez Sanabria

ISBN:978-84-694-0296-2/T-203-2011

6. **R**esultados

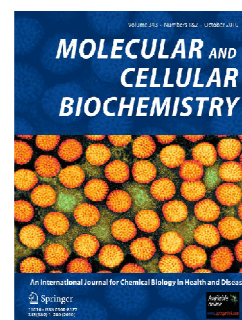
UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTEATOSIS DE ORIGEN DIETÉTICO: ¿LA INFLAMACIÓN Y LA OXIDACIÓN ACTÚAN DE FORMA COORDINADA?

Fernando Rodríguez Sanabria

ISBN:978-84-694-0296-2/T-203-2011

6.1. Estudio 1



Differential response of two models of genetically modified mice fed with high fat and cholesterol diets: relationship to the study of non-alcoholic steatohepatitis

Molecular and Cellular Biochemistry (2010) 343: 59-66

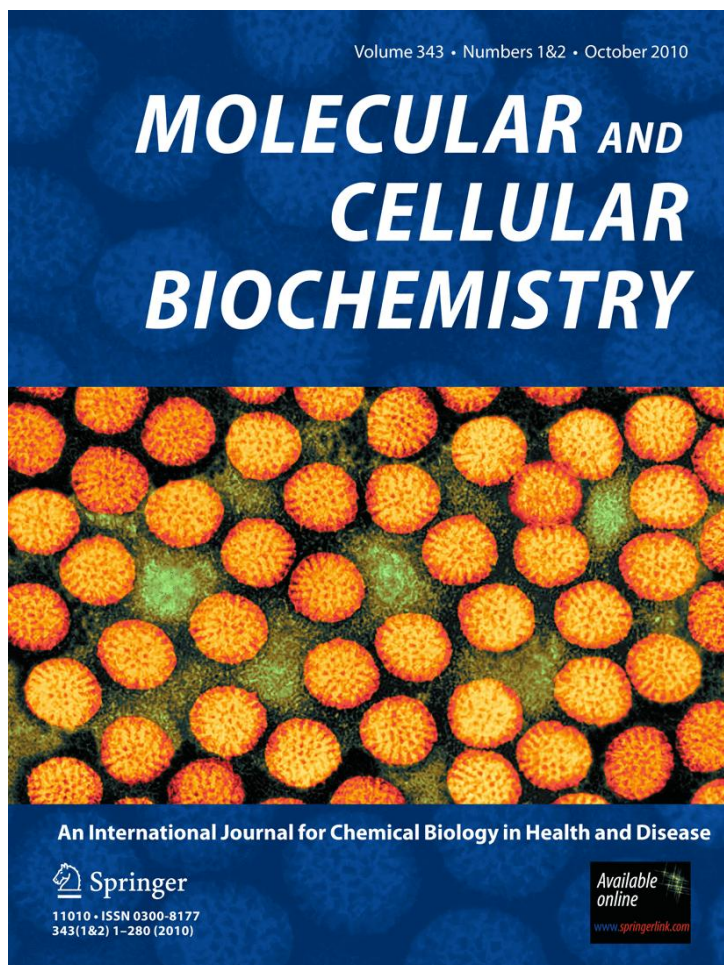
UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTEATOSIS DE ORIGEN DIETÉTICO: ¿LA INFLAMACIÓN Y LA OXIDACIÓN ACTÚAN DE FORMA COORDINADA?

Fernando Rodríguez Sanabria

ISBN:978-84-694-0296-2/T-203-2011

ISSN 0300-8177, Volume 343, Combined 1-2



**This article was published in the above mentioned Springer issue.
The material, including all portions thereof, is protected by copyright;
all rights are held exclusively by Springer Science + Business Media.**

**The material is for personal use only;
commercial use is not permitted.**

**Unauthorized reproduction, transfer and/or use
may be a violation of criminal as well as civil law.**

Differential response of two models of genetically modified mice fed with high fat and cholesterol diets: relationship to the study of non-alcoholic steatohepatitis

Fernando Rodríguez-Sanabria · Anna Rull · Gerard Aragonès ·
Raúl Beltrán-Debón · Carlos Alonso-Villaverde ·
Jordi Camps · Jorge Joven

Received: 2 February 2010 / Accepted: 12 May 2010 / Published online: 29 May 2010
© Springer Science+Business Media, LLC. 2010

Abstract Research on the molecular basis of the hepatic alterations associated to obesity is dependent on the availability of suitable animal models. Apolipoprotein E deficient mice (ApoE^{-/-}) and LDL-receptor deficient mice (LDLr^{-/-}) develop steatosis and steatohepatitis when given pro-atherogenic diets. However, previous data suggest that these two models are not completely interchangeable, and that their metabolic phenotype may partially differ in response to nutrient stimuli. The present study further investigates this question, by comparing changes in hepatic inflammation, lipoprotein metabolism, and their related gene expressions. LDLr^{-/-} mice were more susceptible to the development of obesity and hepatic steatosis, while the ApoE^{-/-} model increased the amount of macrophages and inflammatory nodules in the liver. These changes were accompanied by a differential expression of selected members of the MAPK family and PPARs in the liver.

Keywords Inflammation ·
Non-alcoholic fatty liver disease ·
Non-alcoholic steatohepatitis · Steatosis

Introduction

Metabolic syndrome is often described as a cluster of several coronary heart disease risk factors within a single patient. Among them, obesity, dyslipidemia, insulin resistance, and hypertension are the main components [1, 2]. Individually, these risk factors are considered to be complex diseases under both genetic and environmental control. However, it is clinically evident that metabolic syndrome usually results from an inappropriate relationship with food, particularly fat-enriched diets. Consequently, reduction in body weight resulting from reduced caloric and fat intake is the basis for prevention and treatment of metabolic syndrome.

One important feature of obesity and the metabolic syndrome is non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [3–5]. This is a general term encompassing a wide spectrum of liver derangements ranging from simple steatosis to non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Fat accumulation in the parenchymal cells of the liver is the result of abnormal fatty acid metabolism including an abnormal lipoprotein handling, excessive delivery of fatty acids to the liver respect to the amount which can be metabolized and, in mitochondria, a decreased fatty acid oxidation but also increased compensatory peroxisomal fatty acid oxidation [6]. Clinical studies have demonstrated that the presence of NAFLD and NASH in obese people is not a trivial issue. About 74% of obese patients with NASH have hepatic fibrosis, and about 30% of them would virtually develop cirrhosis [7, 8]. To further complicate the problem, NASH is associated with insulin resistance and diabetes [9].

Investigation on the molecular basis of the hepatic alterations associated to the metabolic syndrome and obesity, and the search for effective treatments are highly

F. Rodríguez-Sanabria and A. Rull contributed equally to this work.

F. Rodríguez-Sanabria · A. Rull · G. Aragonès ·
R. Beltrán-Debón · C. Alonso-Villaverde · J. Camps ·
J. Joven (✉)

Centre de Recerca Biomèdica, Hospital Universitari Sant Joan de Reus, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili, c/Sant Joan s/n, 43201 Reus, Spain
e-mail: jjoven@grupsagessa.com

dependent on the availability of animal models which mimic the human subject from the physiological and metabolic points of view [10, 11]. Several studies have reported the development of steatosis and steatohepatitis in apolipoprotein E deficient mice (ApoE^{-/-}) and LDL-receptor deficient mice (LDLr^{-/-}) given pro-atherogenic diets [12–14], two experimental models widely employed in the field of cardiovascular disease [15, 16]. However, previous data suggest that these two models are not completely interchangeable, and that their metabolic phenotype may partially differ in response to nutrient stimuli [17]. The present study further investigates to this question, by comparing changes in hepatic inflammation, lipid and lipoprotein concentrations, and their related gene expressions, in ApoE^{-/-} mice and LDLr^{-/-} mice fed with a high-fat and high-cholesterol diet.

Materials and methods

Experimental animals and diets

A comparative study was designed and performed in accordance with our institutional guidelines. Male LDLr^{-/-} mice ($n = 24$) and ApoE^{-/-} mice ($n = 24$), in the C57BL/6J background, were the progeny of mice purchased from the Jackson Laboratory. For certain comparisons, wild-type animals from the same genetic background were also used. They were housed under standard conditions and given a commercial mouse diet (14% Protein Rodent Maintenance diet, Harlan, Barcelona, Spain) until the experiment began. The size of the experiment was planned according to previous data [18]. The animals were allocated into experimental groups by computer-generated randomization schedules and investigators responsible for the different assessment of the results had no knowledge of the experimental group to which the animals belonged. At 10 weeks of age, eight animals of each strain were sacrificed and the variables were analyzed (baseline values). The remaining littermates for each model were assigned to two dietary groups ($n = 16$ each) and at 16 weeks of age, the variables were analyzed in eight animals of each group. Diet 1 (control group) was the maintenance diet (3% weight fat, 0.03% cholesterol) that they were previously fed and diet 2 was the same as diet 1 with the addition of palm oil as the source of fat (20% w/w) and cholesterol (0.25% w/w), which incorporate some of the more important characteristics of the Western-style diet. Diets were prepared and labeled by an independent investigator according to the randomization schedule to ensure allocation concealment. No animals were excluded from analysis.

Biochemical measurements

Blood samples were collected from anesthetized animals into EDTA-treated blood collection tubes after 12 h of food deprivation. Plasma glucose, cholesterol and triglycerides concentrations, and alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activities were determined by standard laboratory procedures. Plasma insulin concentrations were measured using radioimmunoassay (Linco, St. Charles, MO). Glucose tolerance tests (GGT) were determined after the intraperitoneal administration of glucose (2 mg/g of body weight) and measurement of plasma glucose at $t = 0, 15, 30, 60$ and 120 min in anesthetized mice. Blood glucose was measured with test glucose strips adapted to the Accucheck sensor system (Roche Diagnostics). The cholesterol and triglyceride contents of liver tissue were determined after lipid extraction with isopropyl alcohol-hexane.

Analysis of mRNA expression and nuclear transcription factors

A portion of perfused liver was flash-frozen and stored at -80°C . Total RNA was isolated from this tissue as previously described [13]. TaqMan primers and probes were obtained from validated Assays-on-Demand products (Applied Biosystems) (Table 1) and were used in real time PCR amplifications on a 7900HT Real Time PCR system. Relative transcript levels were quantified by comparison of measured threshold cycle numbers (Ct) for each reaction with a designated endogenous control via the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method. The samples belonging to the baseline group were normalized respect to values obtained in wild-type mice and defined as the calibrator for each strain and, therefore, the amount of transcripts in the other samples are dimensionless numbers relative to the calibrator levels. ELISA DNA-binding activity assays were performed using liver homogenates following the manufacturer's instructions (Active Motif, Carlsbad, CA, USA) to measure the relative amount of selected nuclear transcription factors belonging to the MAPK family.

Assessment of arteriosclerosis and liver morphology

Samples for the assessment of arteriosclerosis were obtained at the 16-week time-point in ApoE^{-/-} mice and LDLr^{-/-} mice. Once the hearts and regions 2 mm below the ascending aorta had been removed, they were cut transversely, embedded in OCT, and immediately flash-frozen. Aortic valve leaflets were used as an anatomic reference point and a pathological evaluation was performed as described previously [16]. The corresponding

Table 1 Identification of the Assays-on-Demand products used to explore hepatic differences between ApoE^{-/-} and LDLr^{-/-} mice

| Gene name | Gene symbol | Accession number | Assay ID |
|--|----------------|------------------|---------------|
| Peroxisome proliferator activated receptor alpha | <i>ppara</i> | NM_011144 | Mm00440939_m1 |
| Peroxisome proliferator activated receptor delta | <i>ppard</i> | NM_011145 | Mm00803186_g1 |
| Peroxisome proliferator activated receptor gamma | <i>pparg</i> | NM_011146 | Mm00440945_m1 |
| Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1 | <i>acat1</i> | NM_026180 | Mm00507463_m1 |
| ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1 | <i>abca1</i> | NM_013454 | Mm00442646_m1 |
| ATP-binding cassette, sub-family G, member 5 | <i>abcg5</i> | NM_011075 | Mm00446249_m1 |
| ATP-binding cassette, sub-family G, member 8 | <i>abcg8</i> | NM_031884 | Mm00445970_m1 |
| Cytochrome P450, family 27, subfamily a, polypeptide 1 | <i>cyp27a1</i> | NM_024264 | Mm00470430_m1 |
| Cytochrome P450, family 7, subfamily a, polypeptide 1 | <i>cyp7a1</i> | NM_007824 | Mm00484152_m1 |
| Lecithin cholesterol acyltransferase | <i>lcat</i> | NM_008490 | Mm00500505_m1 |
| Lysosomal acid lipase 1 | <i>lip1</i> | NM_021460 | Mm00498820_m1 |
| Scavenger receptor class B, member 1 | <i>scarb1</i> | NM_016741 | Mm00450236_m1 |
| Sterol regulatory element binding transcription factor 1 | <i>srebfl</i> | NM_011480 | Mm01138344_m1 |

fractions of the liver were fixed for 24 h in 10% neutral-buffered formalin, embedded in paraffin, sectioned and stained with hematoxylin and eosin. The proportion of macrophages in the aorta (MOMA-2) and the liver (anti-F4/80) was determined by immunohistochemistry using reagents from Serotec, Oxford, UK. The amount of inflammation and the degree of steatosis were estimated as previously described [19]. Oil Red O stain was prepared using reagents from Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA. Quantitative measurements were performed using the image analysis software, AnaliSYSTM (Soft Imaging System, Münster, Germany).

Statistical analyses

Data were initially analyzed using ANOVA (single-factor or two-factor) and, when necessary, the Mann–Whitney *U* test or the Student's unpaired *t* test. The level of significance was set at $P < 0.05$. Correlation test were performed between PPAR profiles and inflammation and/or steatosis scores. We employed the SPSS/PC software, version 17.0 (SPSS, Chicago, IL).

Results

Both animal models developed significant features of metabolic syndrome but the metabolic phenotype differed substantially when a high-fat, high-cholesterol diet was given. Minor differences were observed in mean body weights at baseline point (23.7 ± 2.1 g in ApoE^{-/-} mice and 22.12 ± 0.85 g in LDLr^{-/-} mice), and results throughout the study are presented as a proportion of weight gain (Fig. 1a). The increase in body weight was

evident in LDLr^{-/-} mice, and significantly higher than that observed in C57BL/6J mice. In contrast, the ApoE^{-/-} model showed only a modest body weight gain during the same period. Therefore, LDLr^{-/-} mice were more sensitive to diet-induced obesity than the ApoE^{-/-} and the wild-type models. These changes were accompanied by significant increase in plasma glucose concentrations in LDLr^{-/-} mice that was only apparent when animals were fed the high-fat diet (Fig. 1b). Something similar occurred with plasma insulin concentrations. Whereas similar results were obtained in both models fed chow diet (0.90 ± 0.2 in ApoE^{-/-} and 1.40 ± 0.3 in LDLr^{-/-} mice), plasma insulin concentrations were significantly higher in LDLr^{-/-} mice fed high-fat diet (1.1 ± 0.3 in ApoE^{-/-} and 5.6 ± 1.1 in LDLr^{-/-} mice). As a consequence, the glucose to insulin ratio (G/I) were only significantly decreased in LDLr^{-/-} mice fed high-fat diet depicting higher degree of insulin resistance in these animal model. However, although glucose tolerance test showed that hyperlipidemic mice cleared glucose from the circulation less efficiently than C57BL/6J mice, there were no significant differences between ApoE^{-/-} and LDLr^{-/-} mice (Fig. 1c). As expected, hyperlipidemia was more evident when mice were fed a high-fat diet (Fig. 1d, e). However, substantial increases in plasma triglycerides were only observed in the ApoE^{-/-} model (Fig. 1e). There were no qualitative morphological differences in the arteriosclerotic lesions between the ApoE^{-/-} model and LDLr^{-/-} mice, but the extent was significantly higher in the second model ($P < 0.001$) (Fig. 1f–i).

The accumulation of lipids in the liver was significantly higher in LDLr^{-/-} mice than in ApoE^{-/-} mice (Fig. 2a–c). This is in accordance with the appearance of liver steatosis, only evident in LDLr^{-/-} mice fed a high-fat diet (Fig. 2d–f). In addition, the putative macrophage inflammatory

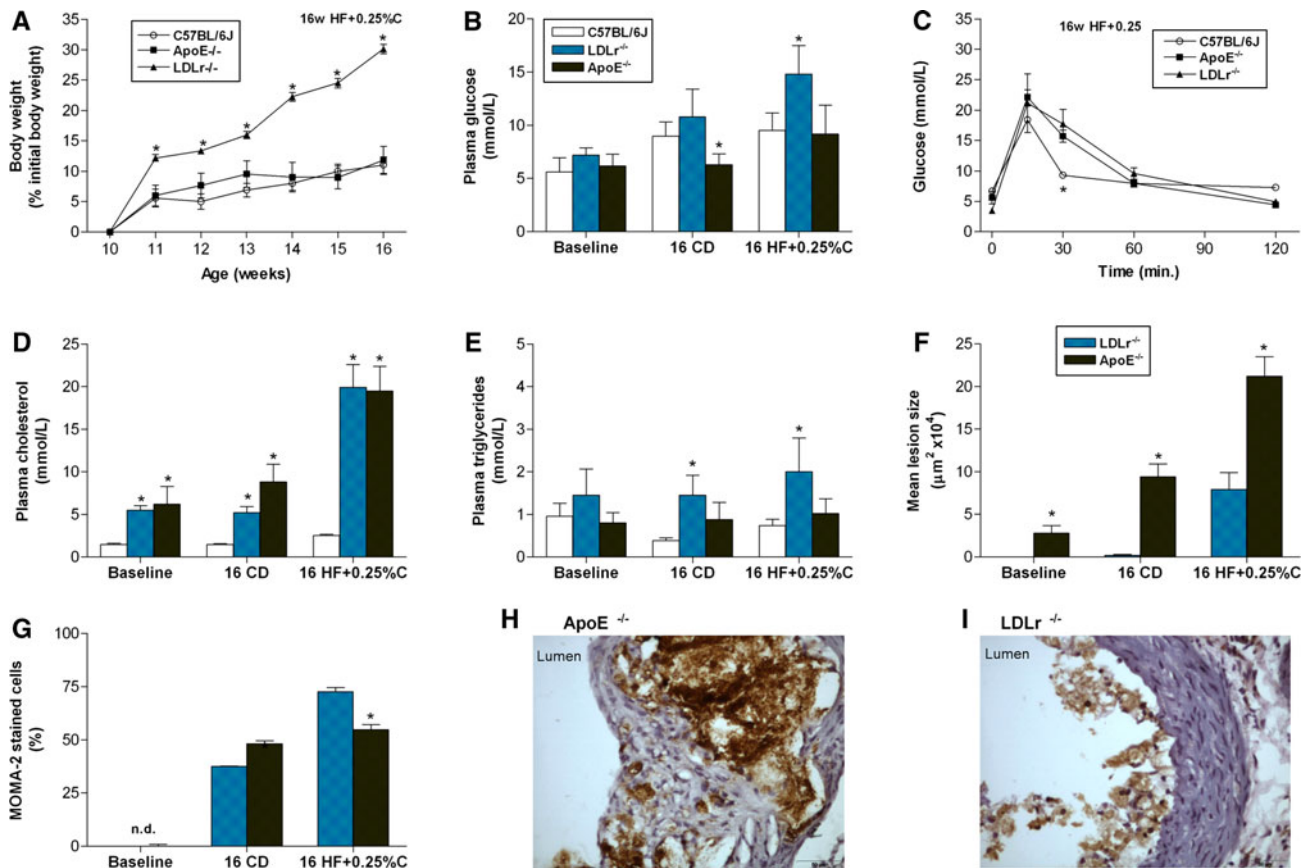


Fig. 1 Metabolic response to a high-fat, high-cholesterol diet of ApoE^{-/-} and LDLr^{-/-} mice as compared to C57BL/6J mice (wild-type). LDLr^{-/-} mice are more sensitive to diet-induced obesity (a) and hyperglycaemia (b), but both models cleared glucose from the circulation less effectively than the wild-type model (c). Both models were hyperlipidemics, however, plasma cholesterol were similar in

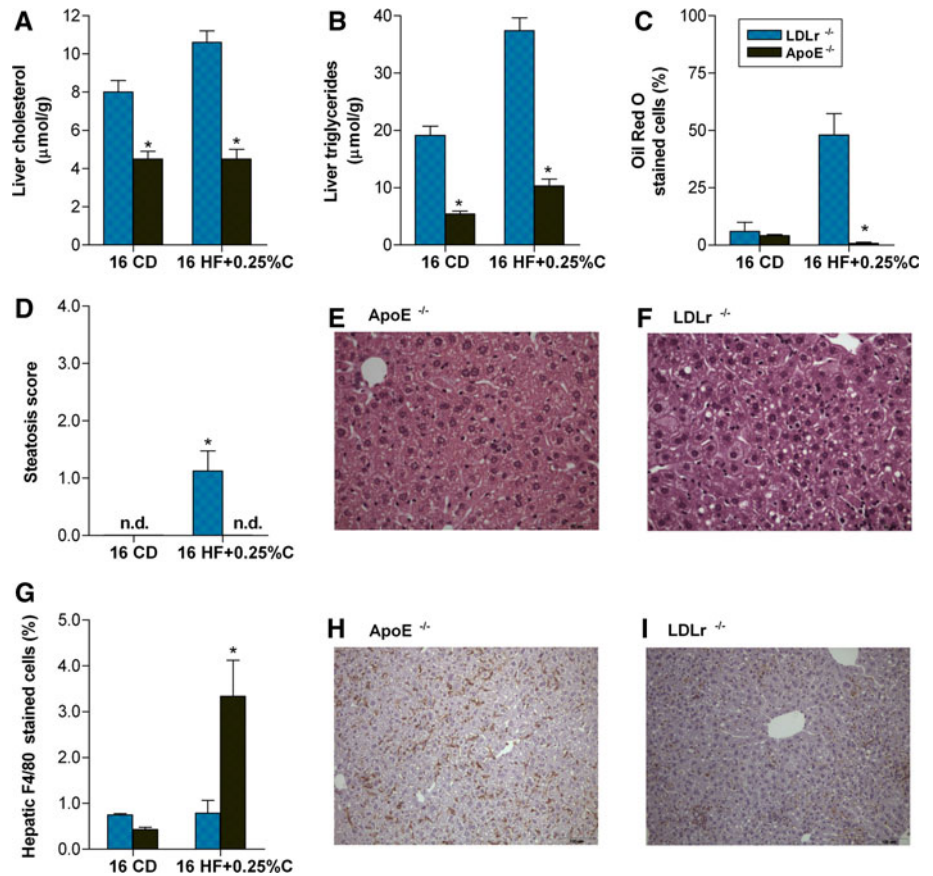
both models (d) and plasma triglycerides (e) were higher in LDLr^{-/-} mice. Atherosclerotic lesion were lower in LDLr^{-/-} mice when compared to ApoE^{-/-} mice (f) but macrophages infiltration in the lesion area was similar in both strains, as shown by the MOMA-2 immunoreactivity (g-i)

response to high-fat diet was also different between strains and was significantly higher in the ApoE^{-/-} model (Fig. 2g-i). In both models, cellular necrosis is unlikely because plasma aminotransferases activities did not change throughout the study (data not shown).

It seems therefore, that dietary modifications, especially high-fat diets, elicit a differential response in these two models. Particularly, differences were mainly due to the development of adiposity, liver steatosis and/or liver inflammation. This may represent a differential response to both lipogenesis and inflammation. To further explore this issue, we measured the expression of several key genes involved in lipoprotein metabolism in the livers of both strains in response to a high-fat diet (Fig. 3). Both strains showed similarly lowered expressions of *Cyp7a1*, *Cyp27a1* and *LCAT* genes. Conversely, the expression of *ABCG5* and *ABCG8* genes, which play central roles in biliary cholesterol secretion, were significantly up-regulated in LDLr^{-/-} mice with respect to baseline values and ApoE^{-/-} mice, indicating constitutive differences in the balance between

bilirubin production and excretion. We also observed decreases in genes related to cholesterol ester and triglyceride hydrolysis [lysosomal acid lipase (*Lip1*)] in ApoE^{-/-} mice. We further assessed the differential response of the liver to this particular dietary modification, measuring the relative amount of selected members of the mitogen-activated protein kinase (*MAPK*) family and the expression of the genes of liver peroxisome proliferator-activated receptors (*PPAR* α , γ and β/δ) for which there are important documented associations with lipogenesis, insulin resistance and inflammation. The expression of activating transcription factor-2 (*ATF-2*) was significantly increased in LDLr^{-/-} mice in response to the high-fat, high-cholesterol diet, compared to the ApoE^{-/-} model (Fig. 3c). Conversely, *c-myc* expression was clearly decreased in LDLr^{-/-} mice with respect to the levels observed in ApoE^{-/-} mice and, in both models, we observed a decrease in *c-myc* expression in response to the high-fat, high-cholesterol diet (Fig. 3d). In LDLr^{-/-} mice, no change in *STAT-1* (signal transducers and activators of transcription-1) and *c-jun* expression were

Fig. 2 Significant increase in hepatic cholesterol (a) and triglycerides (b) content was detected in LDLr^{-/-} mice. The excess of hepatic lipid accumulation was confirmed by Oil Red O stain (c) and it may partially explain the evident differences observed in hepatic steatosis (d–f). Conversely, hepatic inflammation was more intense in ApoE^{-/-} mice, as shown by the hepatic F4/80 immunoreactivity, a marker of mature macrophages (g–i). Values are presented as mean ± SD. * *P* < 0.05 in ApoE^{-/-} mice with respect to the values obtained in LDLr^{-/-} mice



observed, but there were a clear dietary effect in ApoE^{-/-} mice (Fig. 3e, f).

*PPAR*α and γ expression levels were qualitatively similar in both strains, but there were only apparent dietary effects in *PPAR*γ expression of ApoE^{-/-} mice (Fig. 3g). The expression levels were relatively higher for *PPAR*α and relatively lower for *PPAR*γ in LDLr^{-/-} mice. Conversely, a clear and unexpected effect of diet on the expression of *PPAR*β/δ was observed in LDLr^{-/-} mice. Neither the chow diet nor the high fat, high-cholesterol diet changed the expression levels of *PPAR*β/δ during the experiment in ApoE^{-/-} mice. However, LDLr^{-/-} mice on high-fat, high-cholesterol diet exhibited a significant decrease in *PPAR*β/δ expression (Fig. 3g). All these data suggests that high-fat diets may modify different signaling pathways in each animal model. When the possible relationships between *PPAR* expression profiles, and inflammation and/or steatosis score were explored no correlation was obtained in any of the animal models studied.

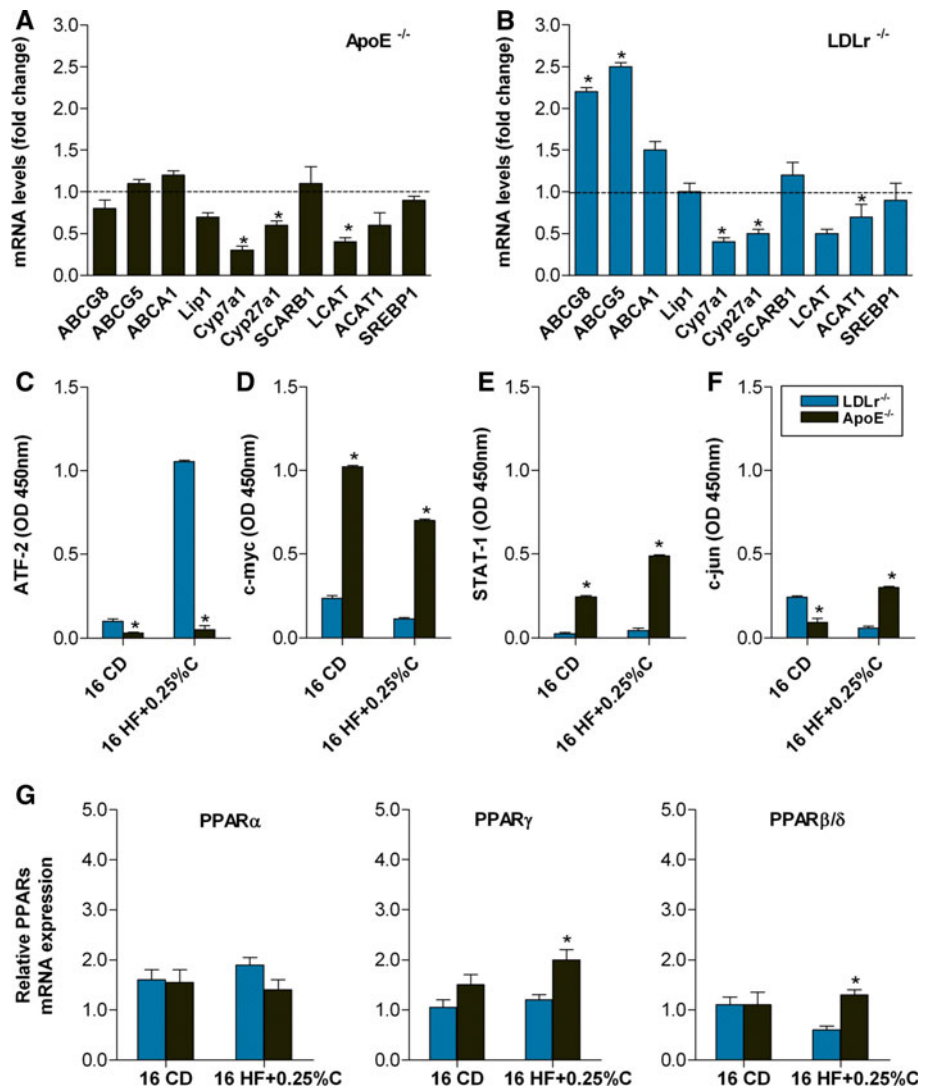
Discussion

Susceptibility to the disease process that leads to obesity and the metabolic syndrome is a reflection of a complex

interaction between genetic and environmental factors. These interactions will likely not be fully resolved without fundamental insights and novel clinical approaches provided by evaluations of an appropriate animal model. Despite the obvious importance of such a model, its development is still at an early stage. Mouse models offer the advantage of relative ease of the generation of genetic alterations. Those models initially developed to study diverse lipoprotein alterations may be useful for studies of the metabolic syndrome [19, 20]. Notably, ApoE^{-/-} mice and LDLr^{-/-} mice are two *de facto* models of arteriosclerosis for which extensive characterization of the actual atherosclerotic lesions is available [8, 13]. Moreover, both models have also been individually crossed with *ob/ob* mice to create strains with obesity and insulin resistance; however, such manipulations induce extreme plasma cholesterol levels and represent superposition with leptin deficiency [21, 22]. Our strategy has been to obtain moderate obesity via use of different diets in these hyperlipidemic mice. We have previously found that these mice, when fed a controlled diet, may be useful models for studies of both abnormal metabolism and pathological evaluation leading to atherosclerosis [12, 16, 19].

Results from the present study show qualitative differences in the development of hepatic alterations in response

Fig. 3 Constitutive differences in the levels of hepatic expression of key genes in lipoprotein metabolism were detected between both models (a, b). Moreover, the effect of dietary fat on the relative amount of selected transcription factors from the mitogen-activated protein kinase (MAPK) family and PPARs family were explored. ATF-2 (c), c-myc (d), STAT-1 (e) and c-jun (f) measurements were performed using a DNA-binding ELISA. The relative mRNA expression levels of PPAR α and PPAR γ (g) were qualitatively similar in both strains in response to the examined diets with some notable quantitative differences. In LDLr^{-/-} mice, PPAR β/δ expression was down-regulated by the high-fat, high-cholesterol diet. Values are presented as mean \pm SD. **P* < 0.05 with respect to the values obtained in LDLr^{-/-} mice



to high-fat, high-cholesterol diets, between both experimental models. ApoE^{-/-} tend to develop a more severe inflammatory reaction, together with hypertriglyceridemia, while LDLr^{-/-} animals are more susceptible to steatosis, obesity, and inappropriate glucose handling. These responses were accompanied by differential changes in the hepatic gene expression. Key genes involved in lipoprotein metabolism were activated or deactivated and the differences were especially apparent for genes involved in the handling of biliary cholesterol. Liver inflammation was another different feature in these models. Our data suggest that liver inflammation was developed independently of the presence of liver steatosis. Therefore, whereas in LDLr^{-/-} mice we did not observe any significant change in the amount of F4/80-stained cells (a marker of mature macrophages), the infiltration was significantly higher in ApoE^{-/-} mice under dietary treatment. To further study this aspect, we explored different pathways that may constitute a link between inflammation and metabolism [23]

and we found that different signaling pathways are modified in each strain as a consequence of dietary intervention. Several changes in ATF-2, a documented regulator of fat metabolism [24], were observed in LDLr^{-/-} mice whereas no changes were found in the ApoE^{-/-} model. ATF-2 was significantly increased in LDLr^{-/-} mice fed high-fat diet. The differential response observed in STAT-1 and c-jun expression may be important as their activation has been implicated in liver inflammation [25]. Liver c-myc expression contributes to the up-regulation of genes involved in the glycolytic pathways and suppresses genes related to hepatic gluconeogenesis. Consequently, this change may be related to the relatively lower propensity for the development of obesity found in ApoE^{-/-} mice in response to a high-fat diet, in concordance with previously published data [26]. Recent data have also documented a direct relationship between c-myc and suppression of PPAR α gene expression, which plays an important role in liver inflammation [27] and may be related to the increased

macrophage infiltration observed in the ApoE^{-/-} mice. The activation of PPAR γ also results in the accumulation of hepatic triglycerides [28]; a finding that is consistent with the increased expression observed in animals fed the high-fat, high-cholesterol diet. Functions of PPAR β/δ have remained elusive, and its metabolic roles have only recently been clarified using specific agonists and appropriate animal models [28]. PPAR β/δ activation decreases hepatic steatosis, reduces the expression of liver inflammatory genes and protects against dietary and genetic obesity. Our results revealed moderate differences in the liver expression of PPAR β/δ in both models. In particular, the high-fat diet depressed the expression of PPAR β/δ , but only in LDLr^{-/-} mice, the model with a higher propensity for obesity, liver steatosis and hypertriglyceridemia.

In conclusion, this study shows that LDLr^{-/-} mice are more susceptible to the development of obesity and hepatic steatosis in response to high-fat and high-cholesterol diets, while ApoE^{-/-} animals are more susceptible to hepatic inflammation. These differences were associated to different changes in the expression of related genes. An implication of these findings is that none of these models completely fulfills the features of human steatohepatitis. As long as an “ideal” animal model is not developed, we suggest the combined use of these two models as potential candidates for the study of obesity-associated NAFLD and NASH.

Acknowledgments This work was supported by grants PI05/1606 and PI08/1381 from the *Instituto de Salud Carlos III*, Madrid, Spain. Anna Rull is the recipient of a fellowship from the Generalitat de Catalunya (FI-G 0503).

Conflict of interest statement The authors have declared no conflict of interest.

References

1. Grundy SM (2008) Metabolic syndrome pandemic. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:629–636
2. Isomaa B (2003) A major health hazard: the metabolic syndrome. *Life Sci* 73:2395–2411
3. Musso G, Gambino R, Cassader M (2009) Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Prog Lipid Res* 48:1–26
4. Petta S, Muratore C, Craxì A (2009) Non-alcoholic fatty liver disease pathogenesis: the present and the future. *Dig Liver Dis* 41:615–625
5. Varela-Rey M, Embade N, Ariz U, Lu SC, Mato JM, Martínez-Chantar ML (2009) Non-alcoholic steatohepatitis and animal models: understanding the human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 41:969–976
6. Begrich K, Igoudjil A, Pessayre D, Fromenty B (2006) Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it. *Mitochondrion* 6:1–28
7. Clark JM (2006) The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in adults. *J Clin Gastroenterol* 40:S5–S10
8. McCullough AJ (2006) Pathophysiology of nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol* 40:S17–S29
9. Brunt EM (2001) Nonalcoholic steatohepatitis: definition and pathology. *Semin Liver Dis* 21:3–16
10. Anstee QM, Goldin RD (2006) Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. *Int J Exp Pathol* 87:1–16
11. Larter CZ, Yeh MM (2008) Animal models of NASH: getting both pathology and metabolic context right. *J Gastroenterol Hepatol* 23:1635–1648
12. Rull A, Escolà-Gil JC, Julve J, Rotllan N, Calpe-Berdiel L, Coll B, Aragonès G, Marsillach J, Alonso-Villaverde C, Camps J, Blanco-Vaca F, Joven J (2007) Deficiency in monocyte chemoattractant protein-1 modifies lipid and glucose metabolism. *Exp Mol Pathol* 83:361–366
13. Rull A, Rodríguez F, Aragonès G, Marsillach J, Beltrán R, Alonso-Villaverde C, Camps J, Joven J (2009) Hepatic monocyte chemoattractant protein-1 is upregulated by dietary cholesterol and contributes to liver steatosis. *Cytokine* 48:273–279
14. Lohmann C, Schäfer N, von Lukowicz T, Sokrates Stein MA, Borén J, Rütli S, Wahli W, Donath MY, Lüscher TF, Matter CM (2009) Atherosclerotic mice exhibit systemic inflammation in periaortic and visceral adipose tissue, liver, and pancreatic islets. *Atherosclerosis* 207:360–367
15. Ishibashi S, Herz J, Maeda N, Goldstein JL, Brown MS (1994) The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in “knockout” mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:4431–4435
16. Calleja L, París MA, Paul A, Vilella E, Joven J, Jiménez A, Beltrán G, Uceda M, Maeda N, Osada J (1999) Low-cholesterol and high-fat diets reduce atherosclerotic lesion development in ApoE-knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:2368–2375
17. Joven J, Rull A, Ferré N, Escolà-Gil JC, Marsillach J, Coll B, Alonso-Villaverde C, Aragonès G, Claria J, Camps J (2007) The results in rodent models of atherosclerosis are not interchangeable: the influence of diet and strain. *Atherosclerosis* 195:e85–e92
18. Tous M, Ferré N, Camps J, Riu F, Joven J (2005) Feeding apolipoprotein E-knockout mice with cholesterol and fat enriched diets may be a model of non-alcoholic steatohepatitis. *Mol Cell Biochem* 268:53–58
19. Tous M, Ferré N, Rull A, Marsillach J, Coll B, Alonso-Villaverde C, Camps J, Joven J (2006) Dietary cholesterol and differential monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in aorta and liver of apo E-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* 340:1078–1084
20. Karagiannides I, Abdou R, Tzortzopoulou A, Voshol PJ, Kypreos KE (2008) Apolipoprotein E predisposes to obesity and related metabolic dysfunctions in mice. *FEBS J* 275:4796–4809
21. Nachtigal P, Pospisilova N, Jamborova G, Pospeschova K, Solichova D, Andrys C, Zdansky P, Micuda S, Semecky V (2008) Atorvastatin has hypolipidemic and anti-inflammatory effects in apoE/LDL receptor-double-knockout mice. *Life Sci* 82:708–717
22. Hasty AH, Shimano H, Osuga J, Namatame I, Takahashi A, Yahagi N, Perrey S, Iizuka Y, Tamura Y, Amemiya-Kudo M, Yoshikawa T, Okazaki H, Ohashi K, Harada K, Matsuzaka T, Sone H, Gotoda T, Nagai R, Ishibashi S, Yamada N (2001) Severe hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, and atherosclerosis in mice lacking both leptin and the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem* 276:37402–37408
23. Alaynick WA (2008) Nuclear receptors, mitochondria and lipid metabolism. *Mitochondrion* 8:329–337
24. Okamura T, Shimizu H, Nagao T, Ueda R, Ishii S (2007) ATF-2 regulates fat metabolism in *Drosophila*. *Mol Biol Cell* 18:1519–1529

25. Gao B (2005) Cytokines, STATs and liver disease. *Cell Mol Immunol* 2:92–100
26. Riu E, Ferre T, Mas A, Hidalgo A, Franckhauser S, Bosch F (2002) Overexpression of c-myc in diabetic mice restores altered expression of the transcription factor genes that regulate liver metabolism. *Biochem J* 368:931–937
27. Stienstra R, Duval C, Müller M, Kersten S (2007) PPARs, obesity, and inflammation. *PPAR Res* 2007:95974
28. Qin X, Xie X, Fan Y, Tian J, Guan Y, Wang X, Zhu Y, Wang N (2008) Peroxisome proliferator-activated receptor-delta induces insulin-induced gene-1 and suppresses hepatic lipogenesis in obese diabetic mice. *Hepatology* 48:432–441

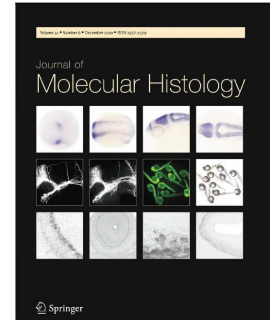
UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTEATOSIS DE ORIGEN DIETÉTICO: ¿LA INFLAMACIÓN Y LA OXIDACIÓN ACTÚAN DE FORMA COORDINADA?

Fernando Rodríguez Sanabria

ISBN:978-84-694-0296-2/T-203-2011

6.2. Estudio 2



Tissue distribution and expression of paraoxonases and chemokines in mouse: the ubiquitous and joint localisation suggest a systemic and coordinated role

Journal of Molecular Histology (2010)

doi: 10.1007/s10735-010-9299-x

Tissue distribution and expression of paraoxonases and chemokines in mouse: the ubiquitous and joint localisation suggest a systemic and coordinated role

**Journal of Molecular
Histology**

ISSN 1567-2379

Volume 41

Number 6

J Mol Hist (2010) 41:379-386

DOI 10.1007/s10735-010-9299-

X



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Science+Business Media B.V.. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your work, please use the accepted author's version for posting to your own website or your institution's repository. You may further deposit the accepted author's version on a funder's repository at a funder's request, provided it is not made publicly available until 12 months after publication.

Tissue distribution and expression of paraoxonases and chemokines in mouse: the ubiquitous and joint localisation suggest a systemic and coordinated role

Fernando Rodríguez-Sanabria · Anna Rull · Raúl Beltrán-Debón · Gerard Aragonès · Jordi Camps · Bharti Mackness · Michael Mackness · Jorge Joven

Received: 29 July 2010 / Accepted: 28 September 2010 / Published online: 8 October 2010
© Springer Science+Business Media B.V. 2010

Abstract A vicious cycle between oxidation and inflammation leads to complications in a growing number of disease states. Knowledge on tissue distribution of chemokines, mediators of inflammatory response, and paraoxonases, with antioxidant and anti-inflammatory actions, may be relevant. Using immunohistochemistry and quantitative real-time PCR we have investigated the distribution of PON1, 2 and 3, CCL2, 7, 8 and 12 and the chemokine receptor CCR2 protein and mRNA in 23 tissues from C57BL/6J mice. As expected, PON1, 2 and 3, CCL2, 7, 8 and 12 and CCR2 proteins were present in the vast majority of tissues investigated. Surprisingly, mRNA for these proteins was also expressed in most of these tissues suggesting local production and the ability to respond in situ to inflammatory stimuli. The wide distribution and expression of mRNA for paraoxonases and CC-chemokines suggest a systemic, probably coordinated, role in the overall inflammatory response.

Keywords CCR2 · Chemokines · Inflammation · Monocyte-chemoattractant protein · Paraoxonase

Introduction

Oxidation and inflammation are present in many disease states as a response to noxious stimuli. Involved mechanisms are strictly regulated and possibly inter-connected. The paraoxonase (PON) multigene family comprises three members, PON1, PON2 and PON3, which are able to inhibit the oxidation of LDL and cell membrane lipids and therefore have anti-inflammatory properties (Aviram and Rosenblat 2004; Mastorikou et al. 2008; Reddy et al. 2008). It was previously believed that PON1 and PON3 had a limited tissue distribution restricted to blood [associated with high-density lipoprotein (HDL)], liver and, perhaps, kidney, while PON2 was fairly ubiquitously present within cells (Draganov and La Du 2004; Ng et al. 2001; Reddy et al. 2001). However, recently reported data in the mouse suggest an unexpectedly wide intracellular tissue distribution of PON1 and PON3 by immunohistochemical analysis (Marsillach et al. 2008; Ng et al. 2007). Similar results on tissue and cell distribution of PON1 and PON2 were reported in human tissues by the Swedish Human Protein Atlas Programme (<http://proteinatlas.org>) indicating a more protective role for the PON family against damaging lipid peroxidation than previously considered.

In the mouse, chemokines (C–C motif) ligand 2, 7, 8 and 12, which are structural and functionally related, are involved in the inflammatory response and are important in recruiting monocytes and other inflammatory cells through interactions with their common receptor CCR2 (Rull et al. 2010b). There are no systematic data on tissue distribution but wide distribution is also suspected. Moreover, the chemokine system is highly redundant such that a deficiency in one does not blunt the inflammatory response (Rull et al. 2010a). Chemokines are involved in attracting

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10735-010-9299-x) contains supplementary material, which is available to authorized users.

F. Rodríguez-Sanabria · A. Rull · R. Beltrán-Debón · G. Aragonès · J. Camps · B. Mackness · M. Mackness (✉) · J. Joven

Centre de Recerca Biomèdica. Hospital Universitari de Sant Joan. Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV), Universitat Rovira i Virgili, C Sant Joan s/n, 43201 Reus, Spain
e-mail: mike.mackness@gmail.com

monocytes to sites of inflammation in a number of diseases including atherosclerosis, pulmonary fibrosis and both degenerative and inflammatory arthritis (Rull et al. 2010b). Also, their expression has been found to be particularly related to perturbations in lipid and glucose metabolism in obesity, the metabolic syndrome and type 2 diabetes (Charo and Ransohoff 2006).

The relationship, if any, between the PON family of anti-inflammatory proteins and the presence/expression of CCLs is unknown, but as PONs block the inflammatory response they would be expected to reduce chemokine expression. In vitro studies have shown that HDL-associated PON1 attenuates the recruitment of monocytes by endothelial cells in co-culture by preventing the upregulation of MCP-1 in response to oxidised-low density lipoprotein (LDL) (Mackness et al. 2004; Mackness and Mackness 2010).

With the rationale that an increase in oxidation leads to the activation of inflammatory cells that further increase the oxidation in a vicious cycle and to test the hypothesis that tissue distribution of both paraoxonases and chemokines is wide and related, we have compared the immunohistochemical presence and their expression levels in tissues isolated from normal mice.

Materials and methods

Animal handling and sampling

The handling of animals and the procedures described were approved by the Ethics Committee of the Rovira i Virgili University. The study was performed in three normal mice (male) from the C57BL/6J strain. At 10 weeks of age, the animals were sacrificed under anaesthesia and they were perfused with saline solution for 10 min before the organs and tissues were removed. These included: aorta, brown adipose tissue, epididymal and inguinal white adipose tissue, large and small intestine, bone marrow, brain, cartilage, eye, submandibular and sublingual glands, heart, kidney, liver, lung, pancreas, stomach, spinal cord, hypothalamus, skeletal muscle, bone, spleen, skin, thymus, testicle and tongue. Portions of organs and tissues were either frozen in nitrogen or fixed in 4% phosphate-buffered formalin for 24 h at room temperature, washed twice with water, stored in 70% ethanol at 4°C, and embedded in paraffin. Paraffin-embedded sections (2 µm thickness) were used for all histological analyses; frozen samples were used to assess gene expression.

Immunohistochemical analyses

CCL2, CCL7, CCL8 and CCL12 primary antibodies were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg,

Germany), the CCR2 antibody was from Abcam (Cambridge, UK) and anti F4/80 (a macrophage marker) was from Serotec (Oxford, UK) used at dilutions of 1:100, 1:100, 1:500, 1:500, 1:200 and 1:6,000, respectively. PON1, PON2, and PON3 antibodies were obtained as described previously (Marsillach et al. 2008) and used at dilutions of 1:300, 1:30, and 1:300, respectively. Biotinylated antirabbit or antigoat secondary antibodies (Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA) were used at a dilution of 1:200. Detection was with the ABC peroxidase system (Vector, Burlingame, CA) using DAB (Dako, Glostrup, Denmark) as the peroxidase substrate. For all the immunohistochemical methods, to assess specificity, controls were treated the same as samples omitting the primary antibodies in the incubation.

Quantitative real-time PCR

Tissue pieces of approximately 20 mg were lysed with RNeasy Plus Lysis Buffer (Qiagen, Izasa, Spain). RNA extraction was performed in a QIAcube (Qiagen) using a column-based isolation method (RNeasy Plus Mini Kit, Qiagen). RNA quality and concentration was determined as the OD_{260/280} ratio in a NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA). Twenty-five ng of total RNA were reverse transcribed into cDNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA). Real-time PCR primers and probes (TaqMan Gene Expression Assays) for the mice genes, which are listed in Supplementary Table 1, were spotted onto a 96-well plate. Thermal cycling and fluorescence detection was performed on Applied Biosystems ABI Prism 7900HT Sequence Detection System with ABI Prism 7900HT SDS Software 2.3. Forty cycles were run with the following parameters: 2 min at 50°C, 10 min at 95°C and, for each cycle, 15 s at 95°C for denaturation and 1 min at 60°C for transcription. A cycle threshold (C_t) value was generated by setting the threshold during the geometric phase of the cDNA sample amplification. Standard curves were performed for each gene of interest, and the mRNA levels for each sample were calculated from these standard curves and expressed relative to the GAPDH mRNA levels to normalize the results of the genes of interest.

Results

The results of the immunohistochemical analysis are described in detail in Figs. 1 and 2 and further illustrated for selected tissues in Fig. 3. Immunostaining for PON1 was found in all tissues. No staining for PON2 was found in small and large intestine, lung, spinal cord or thymus.

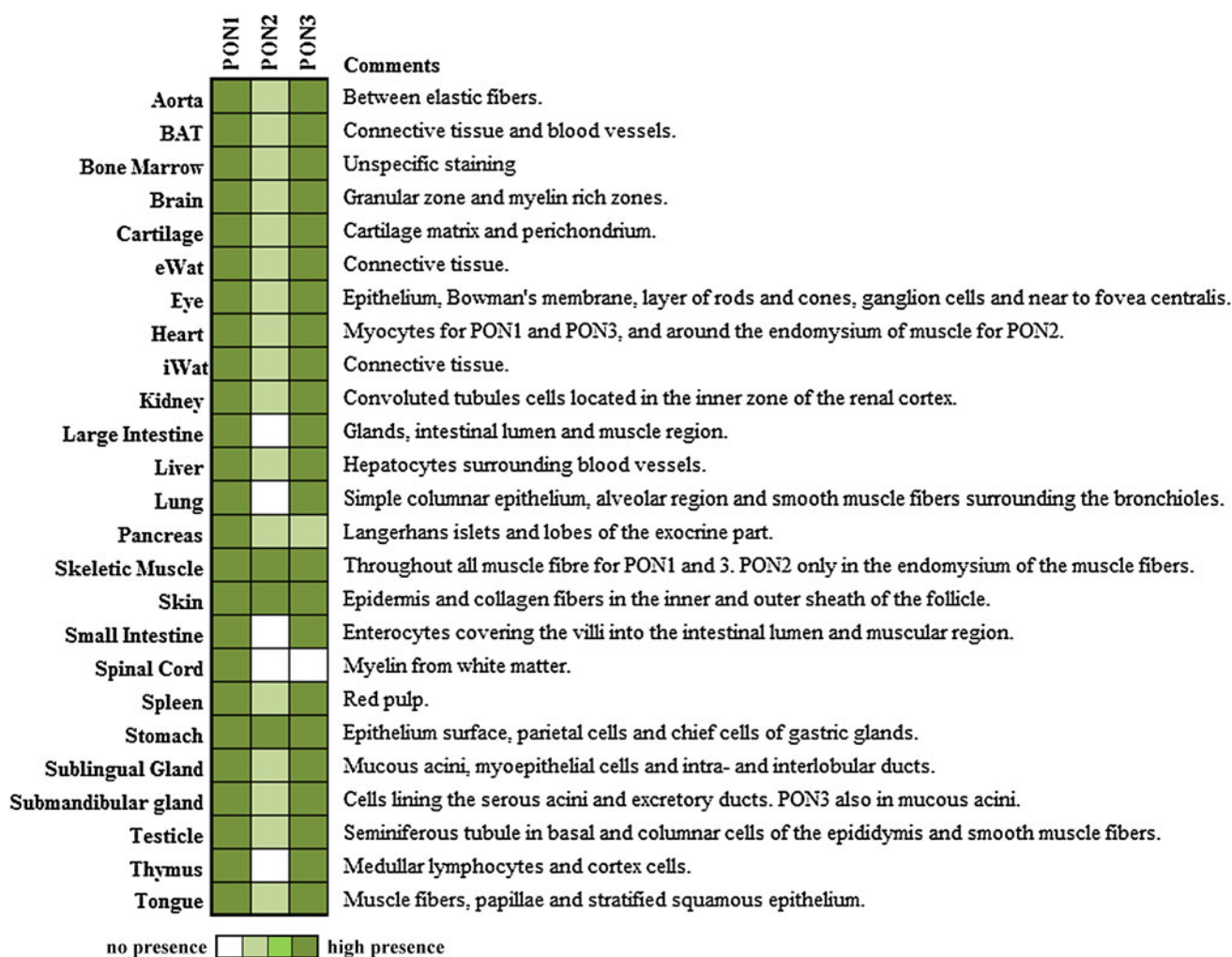


Fig. 1 Detailed immunohistochemical localisation of PON1, 2, and 3 in normal mouse tissues. Details of experimental conditions can be found in [Materials and methods](#)

No PON3 staining was found in spinal cord. In the majority of tissues immunostaining for PON1 and PON3 was much more intense than that of PON2 with the exception of stomach, skeletal muscle and skin, tissues in which staining for all the members of the PON family was intense. Intense staining for CCL2, CCL8 and CCL12 was found in most tissues although staining was weak in aorta, brain, cartilage, kidney and spleen for CCL8. Staining for CCL7 was weaker in all tissues and absent from aorta, cartilage, submandibular gland, heart, small and large intestine and spinal cord. Immunostaining for CCR2 was strong in all tissues. There was a certain consistency in staining between the PON and CCL families, in that tissues which stained strongly for CCL2, 8 and 12 also tended to have strong staining for PON1 and PON3. Tissues that stained weakly for CCL7 also tended to have weak PON2 staining. All tissues contained 1% or less of total cells as macrophages (Fig. 4). As expected, only liver, spleen and bone marrow

showed significant amounts and were undetectable in many tissues.

The normalised results of the gene expression analysis are given in Figs. 5 and 6. Using highly sensitive quantitative real-time PCR, gene expression of all 3 PONs was found in all the 23 tissues tested including those which do not show immunostaining for the respective protein. Normalisation of the results to expression levels of the “housekeeping” gene GADPH indicated that while the expression of PON2 and PON3 was similar in all tissues, the expression of PON1 was highly variable. However, the differential gene expression of all three members of the PON family was highly variable between tissues (Supplementary Data Table 2) probably indicating differences in metabolic activity.

On the other hand, both normalised and differential expression of CCL2, CCL7, CCL8 and CCL12 were highly variable between tissues (Fig. 6 and Supplemental Data

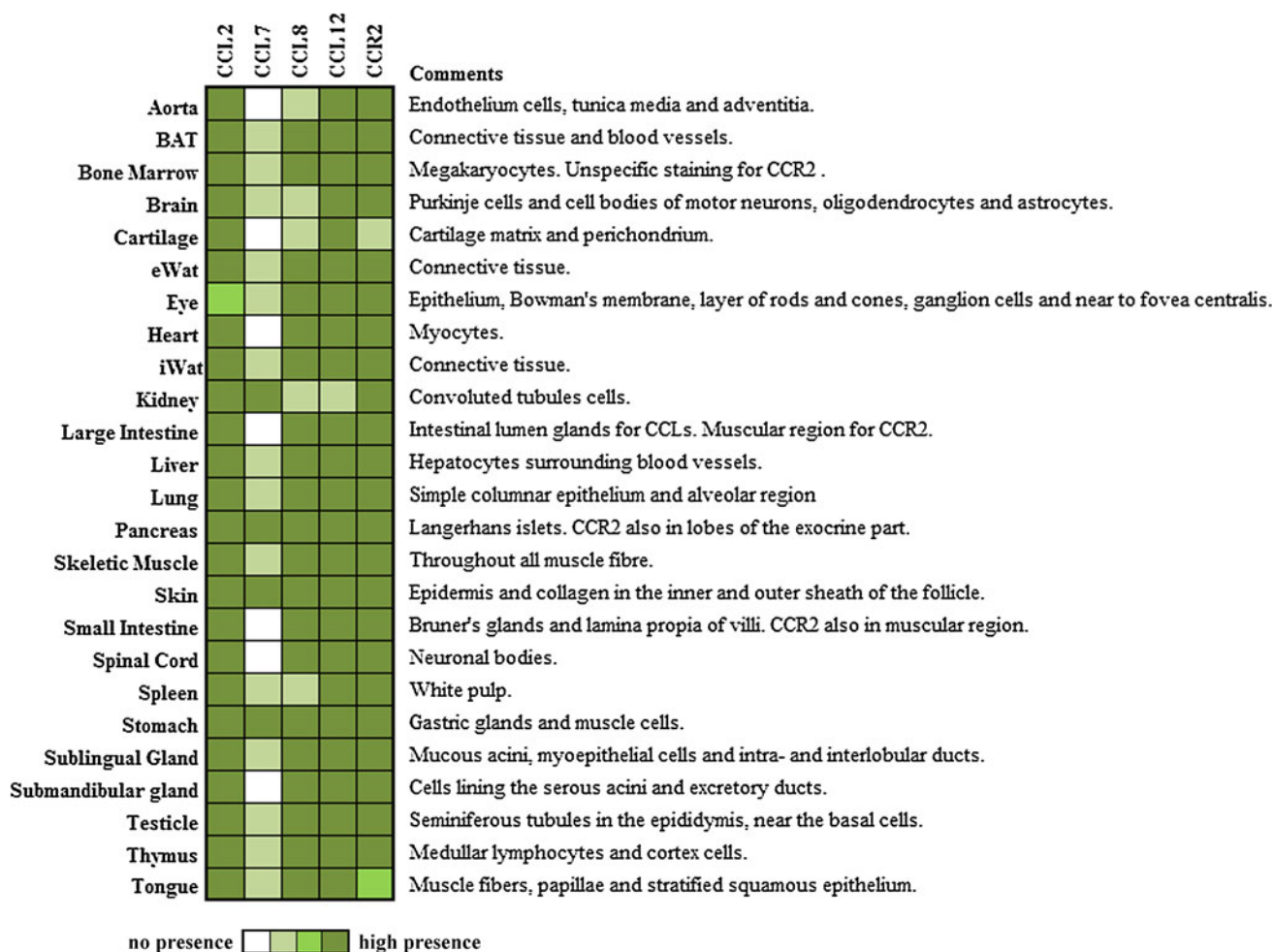


Fig. 2 Detailed immunohistochemical localisation of CCL2, 7, 8 and 12, and CCR2 in normal mouse tissues. Details of experimental conditions can be found in [Materials and methods](#)

Table 2). The expression of CCL2 was higher in all tissues as compared with the other chemokines. Expression of all four CCLs was completely absent from the pancreas, despite this tissue stained strongly for these proteins. In addition, expression of CCL8 was absent from small intestine. Consistent with the immunohistochemical data, gene expression of CCR2 was found in all tissues and was fairly consistently expressed between tissues.

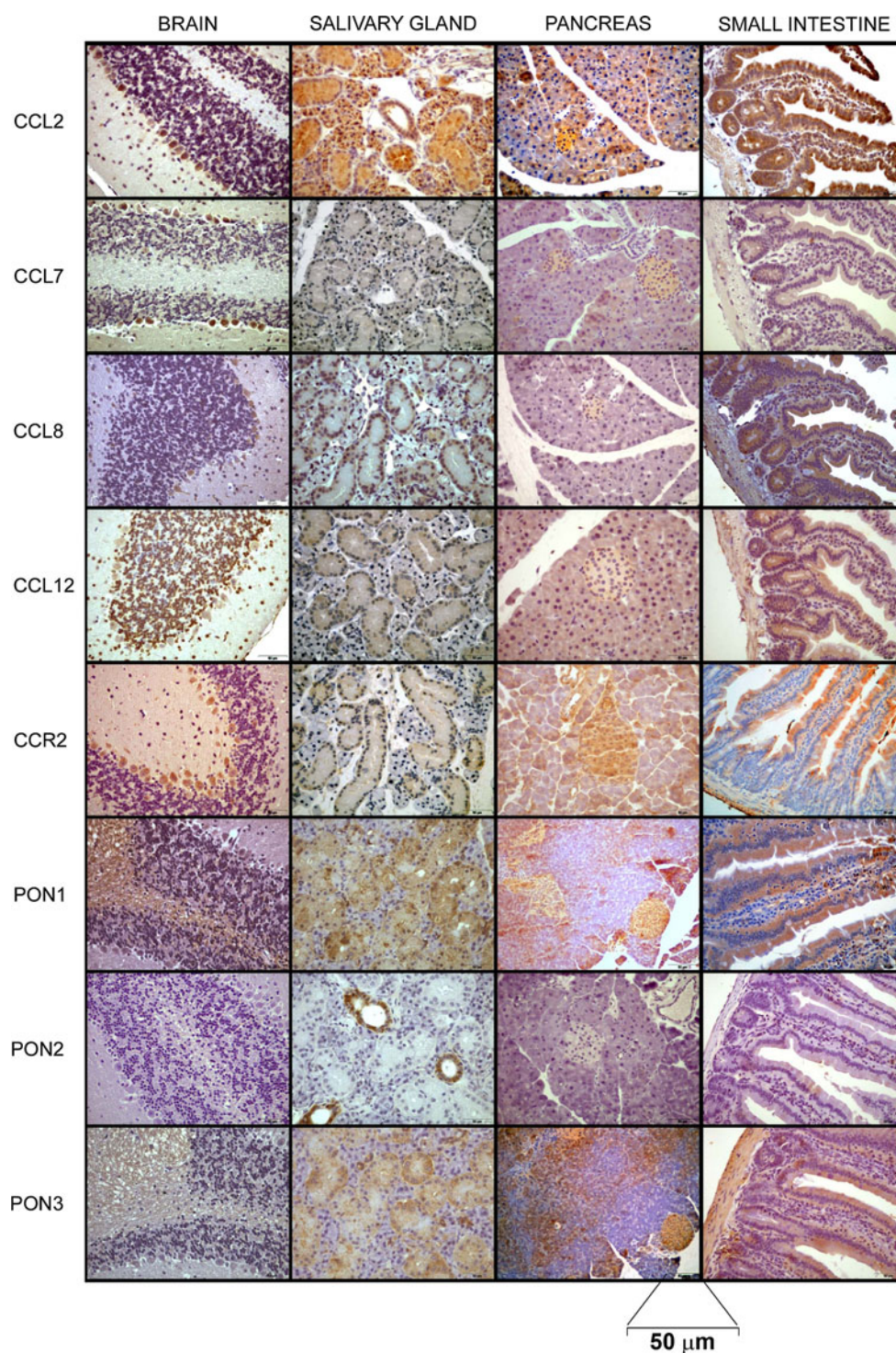
Discussion

This is the first time that gene expression of PON1 and PON3 has been reported in such a large number of tissues from the normal mouse. mRNA studies have indicated the presence of PON1 mRNA in mouse liver, lung, heart, brain, kidney and small intestine (Primo-Parmo et al. 1996), whereas PON2 mRNA was found in these tissues and also pancreas, white blood cells, placenta, skeletal muscle, stomach and testis (Ng et al. 2001). Using in situ

hybridisation, Shih and colleagues found PON3 mRNA in adult mouse adrenal cortex, salivary gland, adipose tissue, liver, lung, skin, pancreas and heart (Shih et al. 2010). However, these studies used methods far less sensitive than the quantitative real-time PCR used here. In fact, as we have recently reported, the choice of the method is a limiting factor (Mackness et al. 2010). PON1, PON2 and PON3 have anti-inflammatory properties due to their ability to metabolise oxidised lipids (Aviram and Rosenblat 2004; Mackness and Mackness 2010; Reddy et al. 2008). Such a wide tissue distribution of mRNA and protein for PON1, 2 and 3 would indicate a much wider role for the PON family in protecting cells and tissues from the damaging consequences of lipid peroxidation and the subsequent inflammation caused by the oxidised lipids than previously believed.

We have found that almost every tissue in the normal mouse immunostained strongly for and expressed the genes for most of the CCL family studied indicating that chemokines are produced constitutively, and not necessarily

Fig. 3 Immunohistochemical localisation of CCL2, 7, 8 and 12, CCR2 and PON1, 2, and 3 in normal mouse brain, salivary gland, pancreas and small intestine. Details of experimental conditions can be found in [Materials and methods](#)



after selective induction, by many cell types. Further, as can be seen from Fig. 4, all tissues contained 1% or less of total cells as macrophages. There was therefore no evidence of extensive inflammation in the tissues, hinting that the CCLs might have other role(s) in the mouse. The nature of these alternative functions is at present unknown but the absence of CCL2 or CCR2 in either $LDLR^{-/-}$ or $ApoE^{-/-}$

backgrounds protects mice from developing atherosclerotic lesions and metabolic disturbances (Boring et al. 1998; Charo and Ransohoff 2006; Han et al. 1998). However, all these actions may vary under different experimental conditions and appear to differ between normal and hyperlipidaemic models. The interpretation of data in these models is even more difficult because the expression of

Fig. 4 Immunohistochemical localisation of the macrophage marker F4/80 in 23 normal mouse tissues. Details of experimental conditions can be found in [Materials and methods](#)

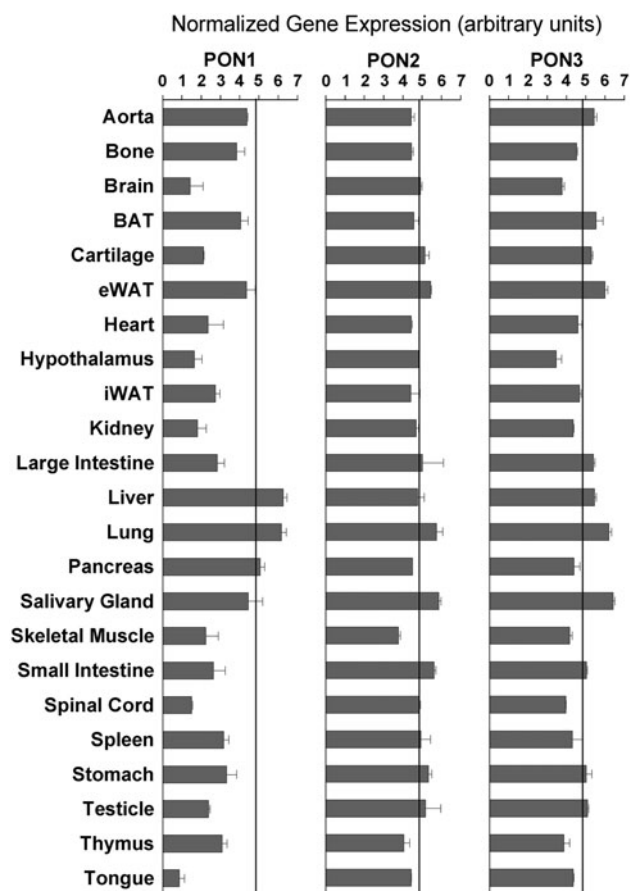
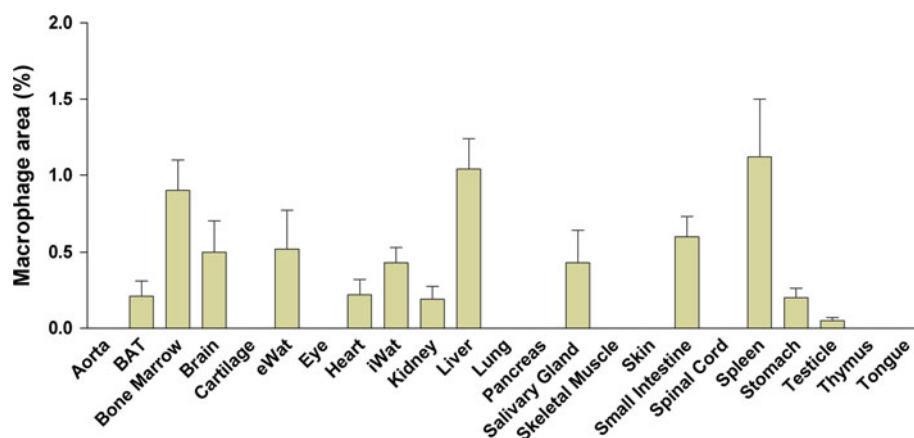


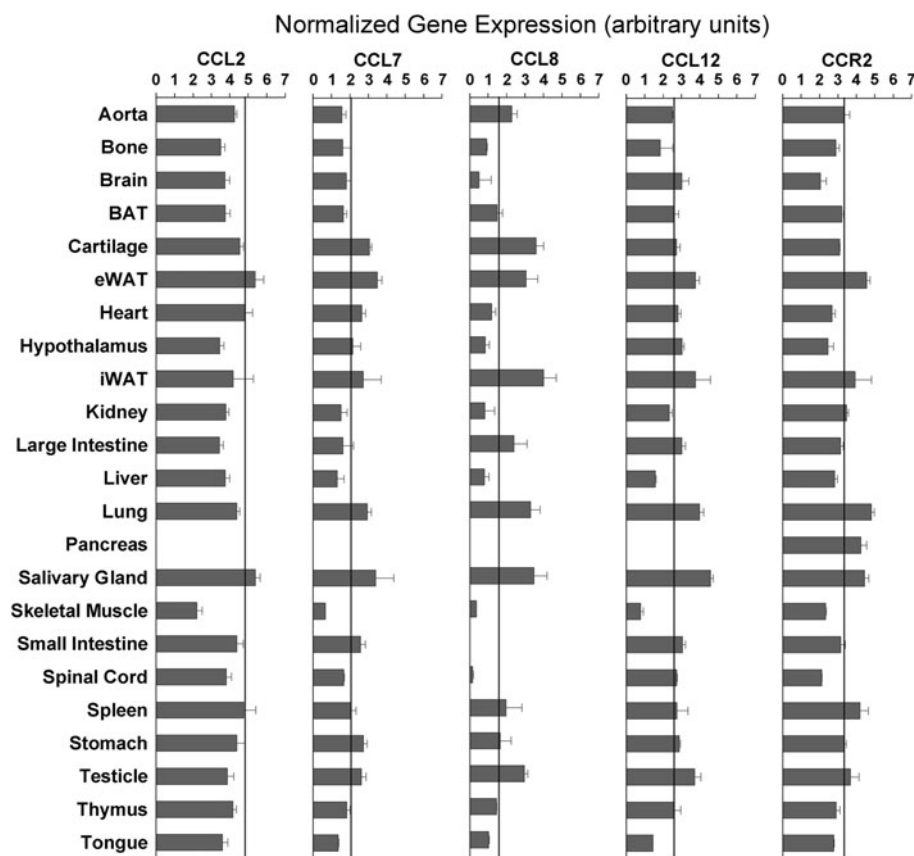
Fig. 5 Normalised gene expression of PON1, 2 and 3 in 23 normal mouse tissues. *Black line* represents the mean of gene expression levels. Details of experimental procedures can be found in [Materials and methods](#)

other chemokine genes in tissues is highly influenced by both the absence of CCL2 and dietary fat and cholesterol (Rull et al. 2010a). It is of note that lipid peroxidation, particularly that of lysophosphatidylcholine, and the consequent oxidative stress and oversecretion of CCL2 have been recently implicated in early stages of adipose tissue

inflammation through a mechanism that involves MEK/ERK, tyrosine kinase, and (to a lesser extent) protein kinase C (PKC) (Rong et al. 2002; Steinbrecher et al. 1984). More recent data suggest that 12/15-lipoxygenase (12/15 LO) is required for the early onset of high fat diet-induced adipose tissue inflammation and insulin resistance in mice (Sears et al. 2009). Cells over-expressing 12/15 LO secreted an excess of CCL2. Accordingly, adipose tissue from 12/15 LO KO mice fed a high-fat diet was not infiltrated by macrophages, did not show any increase in the inflammatory markers and did not exhibit changes in insulin-stimulated glucose disposal rate or hepatic glucose output. All these data suggest the tissue-specific expression of chemokines and consequently a wide ability to respond to appropriate stimuli.

The possibility of local production is further sustained by the fact that CCL2 is a multifunctional molecule and is known to mediate biological effects other than leukocyte chemotaxis, particularly in angiogenesis and in the cell expression of metalloproteinases, in the recruitment of cells active in the fibrotic process, and in the protection against accumulation of oxidative stress proteins (Azfer et al. 2006; Dewald et al. 2005; Niu and Kolattukudy 2009; Salcedo et al. 2000). Moreover, signaling initiated by CCL2 binding to CCR2 trigger the induction of a novel transcription factor, a zinc finger protein that can induce cell death (Zhou et al. 2006). This factor, which has been called MCP-1 induced protein (MCPIP), causes the production of reactive oxygen and nitrogen species via de induction of NADPH oxidase and inducible NO synthase and this oxidative stress causes ER stress that leads to autophagy and cell death (Younce and Kolattukudy 2010). Interestingly, the interaction between CCL2, survivin and autophagy in the complex program of tumour progression has been also previously suggested (Roca et al. 2008). Whether other processes induced by CCL2 are also mediated via MCPIP remains to be ascertained. These intriguing possibilities warrant further extensive investigation.

Fig. 6 Normalised gene expression of CCR2 and CCL2, 7, 8 and 12, in 23 normal mouse tissues. *Black line* represents the mean of gene expression levels. Details of experimental procedures can be found in [Materials and methods](#)



We have also found a large number of anomalies. There are instances where protein is present in a tissue in the absence of gene expression e.g. the CCL family and the pancreas and instances where there is no protein but there is gene expression e.g. PON2 and 3 and the spinal cord. These findings raise questions such as to where pancreatic CCLs come from and where PONs produced in the spinal cord go to. Many possibilities exist; CCLs may be delivered to the pancreas via the circulation and/or surrounding tissues. PON2 and 3 produced by the spinal cord may be secreted into the circulation or, more likely, the PON mRNA may not be translated. However, the answers to these interesting anomalies require further detailed experimentation.

In conclusion, in the normal mouse the PON and CCL families have a wide tissue distribution. The immunohistochemical and gene expression data provided here can be used as a template to analyse possible changes in tissue distribution of the PON and CCL families in mouse models of human disease.

Acknowledgments Supported by grants from the *Instituto de Salud Carlos III* (PI081175 and PI081381), *Ministerio de Sanidad*, Madrid, Spain. GA, AR, and RBD are recipients of post-graduate fellowships from the *Generalitat de Catalunya* (FI06/01054, SGR00503, and FI08/00064 respectively). FRS is a visiting scientist from the Facultad de Salud, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga,

Colombia. Expert technical assistance was provided by Alba Folch and Núria Canela.

References

- Aviram M, Rosenblat M (2004) Paraoxonases 1, 2, and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. *Free Radic Biol Med* 37:1304–1316
- Azfer A, Niu J, Rogers LM, Adamski FM, Kolattukudy PE (2006) Activation of endoplasmic reticulum stress response during the development of ischemic heart disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291:H1411–H1420
- Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF (1998) Decreased lesion formation in *CCR2*^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 394:894–897
- Charo IF, Ransohoff RM (2006) The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 354:610–621
- Dewald O, Zymek P, Winkelmann K, Koerting A, Ren G, Abou-Khamis T, Michael LH, Rollins BJ, Entman ML, Frangogiannis NG (2005) CCL2/Monocyte chemoattractant protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. *Circ Res* 96:881–889
- Draganov DI, La Du BN (2004) Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 369:78–88
- Han KH, Tangirala RK, Green SR, Quehenberger O (1998) Chemokine receptor CCR2 expression and monocyte chemoattractant protein-1-mediated chemotaxis in human monocytes. *A*

- regulatory role for plasma LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:1983–1991
- Mackness B, Mackness M (2010) Anti-inflammatory properties of paraoxonase-1 in atherosclerosis. *Adv Exp Med Biol* 660: 143–151
- Mackness B, Hine D, Liu Y, Mastorikou M, Mackness M (2004) Paraoxonase-1 inhibits oxidised LDL-induced MCP-1 production by endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 318: 680–683
- Mackness B, Beltran-Debon R, Aragonés G, Joven J, Camps J, Mackness M (2010) Human tissue distribution of paraoxonases 1 and 2 mRNA. *IUBMB Life* 62:480–482
- Marsillach J, Mackness B, Mackness M, Riu F, Beltran R, Joven J, Camps J (2008) Immunohistochemical analysis of paraoxonases-1, 2, and 3 expression in normal mouse tissues. *Free Radic Biol Med* 45:146–157
- Mastorikou M, Mackness B, Liu Y, Mackness M (2008) Glycation of paraoxonase-1 inhibits its activity and impairs the ability of high-density lipoprotein to metabolize membrane lipid hydroperoxides. *Diabet Med* 25:1049–1055
- Ng CJ, Wadleigh DJ, Gangopadhyay A, Hama S, Grijalva VR, Navab M, Fogelman AM, Reddy ST (2001) Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *J Biol Chem* 276:44444–44449
- Ng CJ, Bourquard N, Hama SY, Shih D, Grijalva VR, Navab M, Fogelman AM, Reddy ST (2007) Adenovirus-mediated expression of human paraoxonase 3 protects against the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:1368–1374
- Niu J, Kolattukudy PE (2009) Role of MCP-1 in cardiovascular disease: molecular mechanisms and clinical implications. *Clin Sci (Lond)* 117:95–109
- Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN (1996) The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics* 33:498–507
- Reddy ST, Wadleigh DJ, Grijalva V, Ng C, Hama S, Gangopadhyay A, Shih DM, Lusic AJ, Navab M, Fogelman AM (2001) Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:542–547
- Reddy ST, Devarajan A, Bourquard N, Shih D, Fogelman AM (2008) Is it just paraoxonase 1 or are other members of the paraoxonase gene family implicated in atherosclerosis? *Curr Opin Lipidol* 19:405–408
- Roca H, Varsos ZS, Mizutani K, Pienta KJ (2008) CCL2, survivin and autophagy: new links with implications in human cancer. *Autophagy* 4:969–971
- Rong JX, Berman JW, Taubman MB, Fisher EA (2002) Lysophosphatidylcholine stimulates monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in rat aortic smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:1617–1623
- Rull A, Beltran-Debon R, Aragonés G, Rodríguez-Sanabria F, Alonso-Villaverde C, Camps J, Joven J (2010a) Expression of cytokine genes in the aorta is altered by the deficiency in MCP-1: effect of a high-fat, high-cholesterol diet. *Cytokine* 50:121–128
- Rull A, Camps J, Alonso-Villaverde C, Joven J (2010b) Insulin resistance and inflammation: is monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) a relevant effector in the regulation of metabolism? *Mediators of inflammation* (in press)
- Salcedo R, Ponce ML, Young HA, Wasserman K, Ward JM, Kleinman HK, Oppenheim JJ, Murphy WJ (2000) Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood* 96:34–40
- Sears DD, Miles PD, Chapman J, Ofrecio JM, Almazan F, Thapar D, Miller YI (2009) 12/15-lipoxygenase is required for the early onset of high fat diet-induced adipose tissue inflammation and insulin resistance in mice. *PLoS One* 4:e7250
- Shih DM, Xia YR, Yu JM, Lusic AJ (2010) Temporal and tissue-specific patterns of Pon3 expression in mouse: In situ hybridization analysis. *Adv Exp Med Biol* 660:73–87
- Steinbrecher UP, Parthasarathy S, Leake DS, Witztum JL, Steinberg D (1984) Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 3883–3887
- Younce CW, Kolattukudy PE (2010) MCP-1 causes cardiomyoblast death via autophagy resulting from ER stress caused by oxidative stress generated by inducing a novel zinc-finger protein, MCPIP. *Biochem J* 426:43–53
- Zhou L, Azfer A, Niu J, Graham S, Choudhury M, Adamski FM, Younce C, Binkley PF, Kolattukudy PE (2006) Monocyte chemoattractant protein-1 induces a novel transcription factor that causes cardiac myocyte apoptosis and ventricular dysfunction. *Circ Res* 98:1177–1185

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTEATOSIS DE ORIGEN DIETÉTICO: ¿LA INFLAMACIÓN Y LA OXIDACIÓN ACTÚAN DE FORMA COORDINADA?

Fernando Rodríguez Sanabria

ISBN:978-84-694-0296-2/T-203-2011

7. **D**iscusión general

El síndrome metabólico, o conjunto de distintas enfermedades asociadas, es el reflejo de complejas interacciones existentes entre factores genéticos y ambientales, y que constituye el principal problema al que se enfrenta la medicina moderna actual. Los estudios con modelos experimentales, de fácil manipulación, nos permiten día a día avanzar en el estudio de dichas patologías. Contamos con un gran número de modelos animales, que mediante modificaciones genéticas controladas, nos facilitan el estudio de numerosas alteraciones metabólicas combinadas, como pueden ser la obesidad, la arteriosclerosis, la resistencia al insulina o la esteatosis hepática.

Si bien es conocido que la progresión de la esteatosis hepática esta determinada por factores genéticos y ambientales, nuestro conocimiento acerca de esta patología y sus complicaciones queda lejos de ser resuelta. La esteatosis hepática, similar a muchas otras complicaciones metabólicas, es de difícil estudio en los humanos debido a la heterogeneidad de la población, las interacciones genético-ambientales y sobretodo a la dificultad en la obtención de muestras de tejido hepático que nos permitan explorar los mecanismos implicados en la patología. El modelo murino de experimentación animal es el modelo por excelencia que muchos investigadores han escogido para el estudio de la esteatosis hepática y sus complicaciones, puesto que la similitud que presenta el tejido hepático de ratón en cuanto a anatomía, fisiología

y metabólica con el tejido hepático humano es muy elevada. De hecho, el uso de modelos animales nos permite el estudio de las variables que pueden influir en la patología variando indistintamente las condiciones a explorar. De aquí el objetivo de nuestro primer estudio, explorar la influencia de una dieta rica en grasas y colesterol en el desarrollo de esteatosis hepática en modelos que simulan un estado próximo al que podemos encontrar en el síndrome metabólico.

En el primer estudio presentado en esta Tesis se eligieron 2 modelos experimentales, un modelo con deficiencia en la apolipoproteína E y un modelo deficiente en el receptor de las LDL, ambos con alteraciones en el metabolismo de las lipoproteínas, condición que les confiere un estado de hiperlipemia avanzado. De hecho, son numerosos los trabajos que describen como ambos animales son susceptibles al desarrollo de obesidad y las complicaciones que se le asocian, como resistencia a la insulina, arteriosclerosis o esteatosis hepática. Ambos grupos de estudio recibieron el mismo tratamiento nutricional, un aporte alimentario que intenta simular las dietas con exceso de aporte calórico, de consumo creciente en nuestra sociedad. Como se desprende de nuestros resultados ambos modelos respondieron satisfactoriamente a dicha dieta, desarrollando alteraciones metabólicas frecuentes en el síndrome metabólico. Sin embargo, los resultados obtenidos confirmaron una vez más las diferencias patológicas que existen en

ambos modelos (73) y la facilidad que nos ofrecen estos modelos experimentales en el estudio de la interacción genético-ambiental. Concretamente, nuestros esfuerzos se centraron en el estudio del hígado, en su papel de órgano regulador del balance energético de todo el organismo. Observamos que pese a que ambos modelos presentaban hiperlipemia importante, el modelo ApoE^{-/-} respondía al estímulo nutricional con desarrollo de esteatohepatitis hepática, mientras que el modelo LDLr^{-/-} era más susceptible a presentar obesidad y desarrollo de esteatosis hepática sin progresión significativa a esteatohepatitis, identificando diferencias en cuanto a la presencia de inflamación entre ambos animales. Dicha respuesta venía acompañada de cambios diferenciales en la expresión génica evaluada en el hígado de estos ratones. Concretamente detectamos diferencias en la expresión de los genes claves del metabolismo de las lipoproteínas y especialmente en aquellos genes relacionados con el metabolismo de los ácidos biliares. Volviendo a la respuesta inflamatoria, debemos destacar las diferencias más que aparentes entre ambos modelos, un aumento de la esteatosis hepática en el hígado no se correlacionaba con una presencia creciente de células inflamatorias en dicho órgano. Mientras que el modelo LDLr^{-/-} presentaba presencia relevante de esteatosis hepática y moderada infiltración de macrófagos, en el modelo ApoE^{-/-} la respuesta era totalmente opuesta, esteatosis moderada con

grave infiltración de macrófagos. Así pues, una de las conclusiones claras derivadas de este estudio fue descubrir que la presencia de inflamación en el hígado se desarrolla de forma independientemente a la presencia de esteatosis hepática. Para explorar este hallazgo decidimos investigar algunas de las vías metabólicas comunes entre inflamación y metabolismo (74) y efectivamente encontramos diferencias significativas en la activación de las vías de señalización como respuesta a la dieta en cada modelo experimental.

En relación a los cambios de expresión de los factores de transcripción, encontramos un incremento drástico de la expresión del gen ATF-2 en los ratones LDLr^{-/-}, no observable en el modelo ApoE^{-/-}. El factor de transcripción activador 2 (ATF-2) es un factor de transcripción perteneciente a la familia de los factores de transcripción ATF/CREB (75) que se expresa de forma ubicua y que se encuentra en el hígado y el tejido adiposo, órganos clave en la regulación del metabolismo. ATF-2 estimula la expresión de PEPCK-C (phosphoenolpyruvate carboxykinase-cytosolic), un enzima limitante en los procesos de gluconeogenesis y glicerogénesis, precisamente es en éste último proceso donde PEPCK se encarga de regular la biosíntesis de triglicéridos vía glicerol-3-fosfato a partir de piruvato. Así pues, siguiendo la interpretación de nuestros resultados, en el modelo LDLr^{-/-} la acumulación de triglicéridos en el hígado, como respuesta a la dieta

rica en grasa y colesterol, sería consecuencia clara de un incremento de la síntesis de triglicéridos vía incremento de expresión de ATF-2 y el estímulo de expresión de PEPCK. Las diferencias encontradas en la expresión de los factores STAT-1 y c-jun, se asociarían a la activación de los procesos inflamatorios en el hígado de estos animales (76). La activación de STAT1 es esencial para la respuesta de interferon gamma y alpha, mientras que c-jun es un componente del factor de transcripción AP-1, un gen encargado de la regulación de variedad de funciones biológicas, entre las que cabe destacar la proliferación celular, diferenciación o apoptosis (77). Por otro lado, la expresión hepática de c-myc está relacionada con un incremento en la expresión de genes relacionados con las vías glucolíticas y a su vez con la supresión de los genes relacionados con la gluconeogénesis hepática. Nuestros resultados confirman un incremento de expresión de c-myc en los ratones ApoE^{-/-}. Este efecto estaría relacionado a la baja susceptibilidad de los ratones ApoE^{-/-} a presentar obesidad en respuesta a dietas grasas, confirmando resultados anteriormente publicados. Cabe destacar que publicaciones recientes muestran una estrecha relación entre la expresión de c-myc y la supresión en la expresión génica de PPAR α , un gen conocido por cumplir un rol en la inflamación hepática (78) y que por tanto podría relacionarse con la infiltración de macrófagos observada en los ratones ApoE^{-/-}. La activación del PPAR γ se encuentra

asociada a la acumulación de triglicéridos hepáticos (79). una afirmación que se confirma con los resultados encontrados en este trabajo, puesto que vemos un claro incremento en la expresión hepática de PPAR γ en respuesta a la dieta rica en grasa y colesterol. Por otro lado, el conocimiento de las funciones que puede ejercer la expresión de PPAR β/δ en el metabolismo han sido vagamente exploradas, y su conocimiento queda todavía lejos de ser resuelto. Parece ser que una activación de la expresión de PPAR β/δ reduciría la esteatosis hepática, reduciría la expresión de genes relacionados con los procesos inflamatorios del hígado, y protegería frente al desarrollo de obesidad estimulada por la combinación de factores tanto nutricionales como ambientales (80). En nuestro trabajo hallamos cambios moderados en la expresión hepática de PPAR β/δ tanto en el modelo LDLr^{-/-} como en el modelo ApoE^{-/-}. Concretamente, podemos afirmar en base a nuestros resultados que una dieta rica en grasa y colesterol disminuye la expresión hepática de PPAR β/δ en los ratones LDLr^{-/-}, el modelo con mayor susceptibilidad a desarrollar obesidad, esteatosis hepática e hipertrigliceridemia.

Con este primer trabajo comprobamos como un mismo estímulo puede ejercer diferente respuesta debido a la variación genética de los animales. Aunque los resultados no pueden ser concluyentes por tratarse de un modelo experimental, queda claro como los factores

genéticos pueden determinar de forma drástica la respuesta metabólica a una agresión externa con consecuencias en el metabolismo. La esteatosis hepática es un fenómeno que no podemos pasar por alto en nuestra sociedad donde el exceso de nutrientes es una realidad, y aunque esté considerada una enfermedad relativamente benigna, no podemos olvidar que su progresión a esteatohepatitis es un paso crítico con consecuencias graves. El exceso de nutrientes crea un estrés metabólico, no sólo con consecuencias en el hígado sino en muchos otros órganos, que deriva al desarrollo de alteraciones importantes en el metabolismo.

Una situación de estrés oxidativo y la consecuente secreción de factores pro-inflamatorios es una situación habitual en los trastornos metabólicos, creándose por sí sólo un estado inflamatorio crónico, o de baja intensidad, causante del desencadenamiento de una serie de respuestas en distintos tipos celulares. Los procesos inflamatorios y sus consecuencias se hacen patentes mediante la acción concertada de numerosas citocinas, hormonas y factores de transcripción que actúan en red, de forma que la respuesta de un elemento interfiere o activa otro. No está de más considerar que el conocimiento de la distribución tisular tanto de quimiocinas, mediadores de la respuesta inflamatoria, como de las paraoxonasas, con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias,

puede ser relevante en el estudio de la mayoría de alteraciones metabólicas (81-83).

En el segundo trabajo realizamos un estudio de la expresión de la familia de las MCPs y de las paraoxonasas a nivel de expresión genes y de proteínas. Observamos que prácticamente las 4 MCPs (o CCLs) se expresan, tanto a nivel génico como proteómico, en la mayoría de los tejidos de animales sin ningún tipo de alteración metabólica. Este hallazgo nos indica que la producción de quimiocinas, mediadores de la inflamación, no se debe forzosamente como respuesta a un estímulo concreto en el que se desencadene un estado inflamatorio en el organismo. De hecho, para asegurar el grado de inflamación presente en los distintos órganos, comprobamos el porcentaje de macrófagos existente, y vimos que por muy elevada que fuera la expresión de quimiocinas la cantidad de macrófagos infiltrados siempre se mantenía alrededor del 1%. Por tanto, hay que considerar que las quimiocinas desempeñan un papel mucho más amplio en el metabolismo (84). Hasta el momento sabemos que en los modelos $LDLr^{-/-}$ y $ApoE^{-/-}$, la ausencia de CCL2 o CCR2 protege a estos ratones del desarrollo de aterosclerosis y alteraciones metabólicas. Sin embargo, una vez más hemos observado como la variación génica de los animales puede influir en la respuesta metabólica. En nuestros resultados observamos como la ausencia de CCL2 producía una respuesta metabólica distinta entre un

modelo normal y un modelo representativo de hiperlipidemia. Los resultados obtenidos eran más difíciles de interpretar, ya que pudimos ver como al eliminar la expresión de una quimiocina se alteraba la expresión del resto de quimiocinas de distinta forma dependiendo del modelo, y que además los cambios debidos al efecto de una dieta rica en grasas y colesterol también se veían modificados. Por otro lado, trabajos recientes han demostrado que la expresión de CCL2 puede ser específica en tejidos diana del metabolismo, lo que fomenta la posibilidad de dar respuesta concreta a un estímulo apropiado. La peroxidación lipídica, el estrés oxidativo que conlleva, y la consecuente sobre expresión de CCL2, se relacionan con la inflamación en el tejido adiposo en un mecanismo que implica las vías de señalización que requieren la expresión de MEK/ERK, la tirosina quinasa, y la proteína quinasa C (PKC). En un otro estudio reciente con ratones, se observó que la expresión de 12/15 lipoxigenasa (12/15LO) es requerida en la iniciación de inflamación del tejido adiposo y la resistencia a la insulina en respuesta a dietas ricas en grasas. Las células que sobre expresan 12/15LO secretan un exceso de CCL2. En el tejido adiposo de ratones deficientes en 12/15LO alimentados con dietas ricas en grasas se observó que la infiltración de macrófagos era nula, que la expresión de genes relacionados con la inflamación no se veía alterada, y que además no se producían cambios en el metabolismo de la glucosa.(85).

Por otro lado, la posibilidad de que CCL2 sea de producción local es más que justificable. CCL2 es una molécula multifuncional, mediadora de múltiples procesos biológicos que van más allá de su conocido rol como molécula implicada en la quimiotaxis leucocitaria. Recientemente, se ha descubierto como la unión de CCL2 a su receptor CCR2 induce la activación de un nuevo factor de transcripción, conocido como MCP1, con capacidad en la activación de muerte celular. MCP1 fomenta la producción de radicales libres de oxígeno y nitrógeno mediante la inducción de la activación de la oxidasa NADPH y la sintasa NO. El estrés oxidativo que este proceso conlleva causa estrés en el retículo endoplasmático, y como consecuencia inmediata la activación de los procesos de autofagia y muerte celular. Estos datos conjuntamente con estudios recientes, demuestran una estrecha relación entre autofagia, survivina y expresión de CCL2, que en algunos casos ha quedado demostrado que se produce vía MCP1 (86).

Nuestros resultados muestran que no siempre la expresión proteica se corresponde a la expresión de los genes en el mismo tejido. Este efecto nos plantea la duda de dónde provienen las moléculas presentes en un tejido donde la expresión de los genes de esa molécula es nula. Las posibilidades son infinitas, y una respuesta clara necesita una exploración mucho más detallada. Por otro lado, hay que destacar que hasta el momento hemos analizado la distribución en un animal con

condiciones fisiológicas normales. Viendo las dudas que se nos plantean en un caso sin alteraciones metabólicas que compliquen el estudio, es más que relevante seguir con el mismo estudio para comprobar la repuesta en condiciones donde la inflamación y la oxidación estén presentes.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTEATOSIS DE ORIGEN DIETÉTICO: ¿LA INFLAMACIÓN Y LA OXIDACIÓN ACTÚAN DE FORMA COORDINADA?

Fernando Rodríguez Sanabria

ISBN:978-84-694-0296-2/T-203-2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTEATOSIS DE ORIGEN DIETÉTICO: ¿LA INFLAMACIÓN Y LA OXIDACIÓN ACTÚAN DE FORMA COORDINADA?

Fernando Rodríguez Sanabria

ISBN:978-84-694-0296-2/T-203-2011

8. **C**onclusiones finales

El exceso de una dieta rica en grasa y colesterol es uno de los factores ambientales más importantes de nuestra sociedad actual, y que se relaciona con el desarrollo de enfermedades tales como aterosclerosis, esteatosis hepática, obesidad, diabetes y presión arterial alta, y que cuando se agrupan en un mismo individuo lo denominamos síndrome metabólico. Hemos estudiado como las variaciones en la genética animal puede interferir en el efecto que produce una dieta rica en grasas y colesterol.

En respuesta a un mismo estímulo nutricional, el modelo LDLr^{-/-} es más susceptible a desarrollar obesidad y esteatosis hepática, mientras que el modelo ApoE^{-/-} es más susceptible a desarrollar inflamación hepática. Estas diferencias se asocian a diferentes cambios en la expresión de genes relacionados con el metabolismo de los lípidos y la inflamación.

Por otra parte, en el segundo trabajo nuestro objetivo se centraba en la exploración de la relación existente en los procesos de inflamación y oxidación, con el estudio de las MCPs y las paraoxonasas.

Los estudios inmunohistológicos muestran la gran ubicuidad en la expresión proteica de la familia de las MCPs y la familia de las paraoxonasas. Los análisis de expresión genética corroboran los hallazgos encontrados, en la mayoría de tejidos, puesto que en algunos órganos no existe la correlación entre expresión proteica y

génica. Al estudiar la distribución tisular en un modelo sin alteraciones metabólicas declaradas, hemos hallado que la expresión de las quimioquinas no es un fenómeno exclusivo a la respuesta de un estímulo externo. Creemos que los datos mostrados en este estudio pueden ser usados como base para el análisis de los cambios en la distribución tisular de las familias PON y MCPs en las alteraciones metabólicas.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTEATOSIS DE ORIGEN DIETÉTICO: ¿LA INFLAMACIÓN Y LA OXIDACIÓN ACTÚAN DE FORMA COORDINADA?

Fernando Rodríguez Sanabria

ISBN:978-84-694-0296-2/T-203-2011

9. **B**ibliografía

1. Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest.* 2005; 115:1111-9.
2. Lane MD, Tang QQ, Jiang MS. Role of the CCAAT enhancer binding proteins(C/EBPs) in adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 266:677-83.
3. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* 2006; 14; 444:860-7.
4. Glass CK, Rosenfeld MG. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev.* 2000; 14:121-41.
5. Delerive P, De Bosscher K, Besnard S, Vanden Berghe W, Peters JM, Gonzalez FJ, Fruchart JC, Tedgui A, Haegeman G, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J Biol Chem.*1999; 274:32048-54.
6. Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature.*1998; 391:79-82.
7. Grün F, Blumberg B. Minireview: the case for obesogens. *Mol Endocrinol.* 2009; 23:1127-34.
8. Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest.*1993; 91:2546-51.
9. Oliveira HR, Verlengia R, Carvalho CR, Britto LR, Curi R, Carpinelli AR. Pancreatic beta-cells express phagocyte-like NAD(P)H oxidase. *Diabetes.* 2003; 52:1457-63.
10. Ozcan L, Ergin AS, Lu A, Chung J, Sarkar S, Nie D, Myers MG Jr, Ozcan U. Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance. *Cell Metab.*2009; 9:35-51.
11. Kliewer SA, Xu HE, Lambert MH, Willson TM. Peroxisome proliferator-activated receptors: from genes to physiology. *Recent Prog Horm Res.* 2001;56:239-63.
12. Yu S, Matsusue K, Kashireddy P, Cao WQ, Yeldandi V, Yeldandi AV, Rao MS, Gonzalez FJ, Reddy JK. Adipocyte-specific gene

expression and adipogenic steatosis in the mouse liver due to peroxisome proliferator-activated receptor gamma1 (PPARgamma1) overexpression. *J Biol Chem.*2003; 278:498-505.

13. Chawla A, Schwarz EJ, Dimaculangan DD, Lazar MA. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. *Endocrinology.* 1994; 135:798-800.

14. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell.* 1994 Dec 30;79(7):1147-56.

15. Wang YX. PPARs: diverse regulators in energy metabolism and metabolic diseases. *Cell Res.* 2010; 20:124-37.

16. Carroll L, Voisey J, van Daal A. Mouse models of obesity. *Clin Dermatol.* 2004; 22:345-9.

17. Qiu J, Ogus S, Mounzih K, Ewart-Toland A, Chehab FF. Leptin-deficient mice backcrossed to the BALB/cJ genetic background have reduced adiposity, enhanced fertility, normal body temperature, and severe diabetes. *Endocrinology.* 2001; 142:3421-5.

18. Haluzik M, Colombo C, Gavrilova O, Chua S, Wolf N, Chen M, Stannard B, Dietz KR, Le Roith D, Reitman ML. Genetic background (C57BL/6J versus FVB/N) strongly influences the severity of diabetes and insulin resistance in ob/ob mice. *Endocrinology.* 2004; 145:3258-64.

19. Merat S, Casanada F, Sutphin M, Palinski W, Reaven PD. Western-type diets induce insulin resistance and hyperinsulinemia in LDL receptor-deficient mice but do not increase aortic atherosclerosis compared with normoinsulinemic mice in which similar plasma cholesterol levels are achieved by a fructose-rich diet. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19:1223-30.

20. Huang Y, Schwendner SW, Rall SC Jr, Mahley RW. Hypolipidemic and hyperlipidemic phenotypes in transgenic mice expressing human apolipoprotein E2. *J Biol Chem.* 1996; 271:29146-51.

21. Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, Rubin EM, Bresnahan JL. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis

in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*.1992; 71:343-53.

22. Gao J, Katagiri H, Ishigaki Y, Yamada T, Ogihara T, Imai J, Uno K, Hasegawa Y, Kanzaki M, Yamamoto TT, Ishibashi S, Oka Y. Involvement of apolipoprotein E in excess fat accumulation and insulin resistance. *Diabetes*. 2007; 56:24-33.

23. Hofmann SM, Perez-Tilve D, Greer TM, Coburn BA, Grant E, Basford JE, Tschöp MH, Hui DY. Defective lipid delivery modulates glucose tolerance and metabolic response to diet in apolipoprotein E-deficient mice. *Diabetes*. 2008; 57:5-12.

24. Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE, Herz J. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest*. 1993; 92:883-93.

25. Wu L, Vikramadithyan R, Yu S, Pau C, Hu Y, Goldberg IJ, Dansky HM. Addition of dietary fat to cholesterol in the diets of LDL receptor knockout mice: effects on plasma insulin, lipoproteins, and atherosclerosis. *J Lipid Res*. 2006; 47:2215-22.

26. Wu VY, Walz DA, McCoy LE. Purification and characterization of human and bovine platelet factor 4. *Prep Biochem*. 1977; 7:479-93.

27. Ruffini PA, Morandi P, Cabioglu N, Altundag K, Cristofanilli M. Manipulating the chemokine-chemokine receptor network to treat cancer. *Cancer*. 2007; 109:2392-404.

28. Rollins BJ. Chemokines. *Blood*. 1997; 90:909-28.

29. Naruse K, Ueno M, Satoh T, Nomiya H, Tei H, Takeda M, Ledbetter DH, Coillie EV, Opdenakker G, Gunge N, Sakaki Y, Iio M, Miura R. A YAC contig of the human CC chemokine genes clustered on chromosome 17q11.2. *Genomics*. 1996; 34:236-40.

30. Ebisawa M, Yamada T, Bickel C, Klunk D, Schleimer RP. Eosinophil transendothelial migration induced by cytokines. III. Effect of the chemokine RANTES. *J Immunol*. 1994; 153:2153-60.

31. Barna BP, Pettay J, Barnett GH, Zhou P, Iwasaki K, Estes ML. Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 expression in adult human non-neoplastic astrocytes is sensitive to tumor necrosis factor

(TNF) or antibody to the 55-kDa TNF receptor. *J Neuroimmunol.* 1994; 50:101-7.

32. Yoshimura T, Robinson EA, Tanaka S, Appella E, Leonard EJ. Purification and amino acid analysis of two human monocyte chemoattractants produced by phytohemagglutinin-stimulated human blood mononuclear leukocytes. *J Immunol.* 1989; 142:1956-62.

33. Yoshimura T, Leonard EJ. Human monocyte chemoattractant protein-1: structure and function. *Cytokines.* 1992; 4:131-52.

34. Yoshimura T, Yuhki N, Moore SK, Appella E, Lerman MI, Leonard EJ. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Full-length cDNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE. *FEBS Lett.* 1989; 244:487-93.

35. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res.* 2009 ; 29:313-26.

36. Koenig W, Khuseyinova N. Biomarkers of atherosclerotic plaque instability and rupture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27:15-26.

37. Coll B, Alonso-Villaverde C, Joven J. Monocyte chemoattractant protein-1 and atherosclerosis: is there room for an additional biomarker? *Clin Chim Acta.* 2007; 383:21-9.

38. Rull A, Escolà-Gil JC, Julve J, Rotllan N, Calpe-Berdiel L, Coll B, Aragonés G, Marsillach J, Alonso-Villaverde C, Camps J, Blanco-Vaca F, Joven J. Deficiency in monocyte chemoattractant protein-1 modifies lipid and glucose metabolism. *Exp Mol Pathol.* 2007; 83:361-6.

39. Rull A, Rodríguez F, Aragonès G, Marsillach J, Beltrán R, Alonso-Villaverde C, Camps J, Joven J. Hepatic monocyte chemoattractant protein-1 is upregulated by dietary cholesterol and contributes to liver steatosis. *Cytokine.* 2009; 48:273-9.

40. Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Egashira K, Kasuga M. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest.* 2006; 116:1494-505.

41. Kouyama K, Miyake K, Zenibayashi M, Hirota Y, Teranishi T, Tamori Y, Kanda H, Sakaguchi K, Ohara T, Kasuga M. Association of serum MCP-1 concentration and MCP-1 polymorphism with insulin resistance in Japanese individuals with obese type 2 diabetes. *Kobe J Med Sci.*2008; 53:345-54.
42. Zhou L, Azfer A, Niu J, Graham S, Choudhury M, Adamski FM, Younce C, Binkley PF, Kolattukudy PE. Monocyte chemoattractant protein-1 induces a novel transcription factor that causes cardiac myocyte apoptosis and ventricular dysfunction. *Circ Res.* 2006; 98:1177-85.
43. Niu J, Kolattukudy PE. Role of MCP-1 in cardiovascular disease: molecular mechanisms and clinical implications. *Clin Sci (Lond).* 2009; 117:95-109.
44. Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med.* 2006; 354:610-21.
45. Proost P, Wuyts A, Van Damme J. Human monocyte chemotactic proteins-2 and -3: structural and functional comparison with MCP-1. *J Leukoc Biol.*1996; 59:67-74.
46. Rull A, Beltrán-Debón R, Aragonès G, Rodríguez-Sanabria F, Alonso-Villaverde C, Camps J, Joven J. Expression of cytokine genes in the aorta is altered by the deficiency in MCP-1: effect of a high-fat, high-cholesterol diet. *Cytokine.* 2010; 50:121-8.
47. Huber J, Kiefer FW, Zeyda M, Ludvik B, Silberhumer GR, Prager G, Zlabinger GJ, Stulnig TM. CC chemokine and CC chemokine receptor profiles in visceral and subcutaneous adipose tissue are altered in human obesity. *J Clin Endocrinol Metab.*2008; 93:3215-21.
48. Quinones MP, Martinez HG, Jimenez F, Estrada CA, Dudley M, Willmon O, Kulkarni H, Reddick RL, Fernandes G, Kuziel WA, Ahuja SK, Ahuja SS. CC chemokine receptor 5 influences late-stage atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2007;195:e92-103.
49. Wells TN, Power CA, Lusti-Narasimhan M, Hoogewerf AJ, Cooke RM, Chung CW, Peitsch MC, Proudfoot AE. Selectivity and antagonism of chemokine receptors. *J Leukoc Biol.* 1996; 59:53-60.

50. Mantovani A. The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol Today*. 1999; 20:254-7.
51. Charo IF, Myers SJ, Herman A, Franci C, Connolly AJ, Coughlin SR. Molecular cloning and functional expression of two monocyte chemoattractant protein 1 receptors reveals alternative splicing of the carboxyl-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91:2752-6.
52. Bartoli C, Civatte M, Pellissier JF, Figarella-Branger D. CCR2A and CCR2B, the two isoforms of the monocyte chemoattractant protein-1 receptor are up-regulated and expressed by different cell subsets in idiopathic inflammatory myopathies. *Acta Neuropathol*. 2001; 102:385-92.
53. Cho ML, Yoon BY, Ju JH, Jung YO, Jhun JY, Park MK, Park SH, Cho CS, Kim HY. Expression of CCR2A, an isoform of MCP-1 receptor, is increased by MCP-1, CD40 ligand and TGF-beta in fibroblast like synoviocytes of patients with RA. *Exp Mol Med*. 2007; 39:499-507.
54. Weisberg SP, Hunter D, Huber R, Lemieux J, Slaymaker S, Vaddi K, Charo I, Leibel RL, Ferrante AW Jr. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest*. 2006 Jan;116(1):115-24. Epub 2005 Dec 8. Erratum in: *J Clin Invest*. 2006; 116:1457.
55. Leviev I, Negro F, James RW. Two alleles of the human paraoxonase gene produce different amounts of mRNA. An explanation for differences in serum concentrations of paraoxonase associated with the (Leu-Met54) polymorphism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997; 17:2935-9.
56. Ng CJ, Wadleigh DJ, Gangopadhyay A, Hama S, Grijalva VR, Navab M, Fogelman AM, Reddy ST. Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *J Biol Chem*. 2001; 276:44444-9.
57. Aldridge WN. Serum esterases. I. Two types of esterase (A and B) hydrolyzing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. *Biochem J*. 1953; 53:110-7.
58. Aldridge WN. Serum esterases. II. An enzyme hydrolysing diethyl p-nitrophenyl phosphate (E600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera. *Biochem J*. 1953; 53:117-24.

59. Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett.* 1991; 286:152-4.
60. Billecke S, Draganov D, Counsell R, Stetson P, Watson C, Hsu C, La Du BN. Human serum paraoxonase (PON1) isozymes Q and R hydrolyze lactones and cyclic carbonate esters. *Drug Metab Dispos.* 2000; 28:1335-42.
61. Jakubowski H. Homocysteine thiolactone: metabolic origin and protein homocysteinylation in humans. *J Nutr.* 2000; 130:377S-381S.
62. Costa LG, Cole TB, Vitalone A, Furlong CE. Measurement of paraoxonase (PON1) status as a potential biomarker of susceptibility to organophosphate toxicity. *Clin Chim Acta.* 2005; 352:37-47.
63. Shih DM, Gu L, Xia YR, Navab M, Li WF, Hama S, Castellani LW, Furlong CE, Costa LG, Fogelman AM, Lusis AJ. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature.* 1998; 394:284-7.
64. Shih DM, Xia YR, Wang XP, Miller E, Castellani LW, Subbanagounder G, Cheroutre H, Faull KF, Berliner JA, Witztum JL, Lusis AJ. Combined serum paraoxonase knockout/apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *J Biol Chem.* 2000; 275:17527-35.
65. Tward A, Xia YR, Wang XP, Shi YS, Park C, Castellani LW, Lusis AJ, Shih DM. Decreased atherosclerotic lesion formation in human serum paraoxonase transgenic mice. *Circulation.* 2002; 106:484-90.
66. Oda MN, Bielicki JK, Ho TT, Berger T, Rubin EM, Forte TM. Paraoxonase 1 overexpression in mice and its effect on high-density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 290:921-7.
67. Navab M, Imes SS, Hama SY, Hough GP, Ross LA, Bork RW, Valente AJ, Berliner JA, Drinkwater DC, Laks H, et al. Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in cocultures of human aortic wall cells is due to induction of monocyte chemotactic protein 1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein. *J Clin Invest.* 1991; 88:2039-46.

68. Mackness B, Hine D, Liu Y, Mastorikou M, Mackness M. Paraonase-1 inhibits oxidised LDL-induced MCP-1 production by endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 318:680-3.
69. Draganov DI, Stetson PL, Watson CE, Billecke SS, La Du BN. Rabbit serum paraonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. *J Biol Chem*. 2000; 275:33435-42.
70. Draganov DI, La Du BN. Pharmacogenetics of paraonases: a brief review. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2004; 369:78-88.
71. Calleja L, París MA, Paul A, Vilella E, Joven J, Jiménez A, Beltrán G, Uceda M, Maeda N, Osada J. Low-cholesterol and high-fat diets reduce atherosclerotic lesion development in ApoE-knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999; 19:2368-75.
72. Marsillach J, Mackness B, Mackness M, Riu F, Beltrán R, Joven J, Camps J. Immunohistochemical analysis of paraonases-1, 2, and 3 expression in normal mouse tissues. *Free Radic Biol Med*. 2008; 45:146-57.
73. Joven J, Rull A, Ferré N, Escolà-Gil JC, Marsillach J, Coll B, Alonso-Villaverde C, Aragones G, Claria J, Camps J. The results in rodent models of atherosclerosis are not interchangeable: the influence of diet and strain. *Atherosclerosis*. 2007; 195:e85-92.
74. Alaynick WA. Nuclear receptors, mitochondria and lipid metabolism. *Mitochondrion*. 2008; 8:329-37.
75. Okamura T, Shimizu H, Nagao T, Ueda R, Ishii S. ATF-2 regulates fat metabolism in *Drosophila*. *Mol Biol Cell*. 2007; 18:1519-29.
76. Gao B. Cytokines, STATs and liver disease. *Cell Mol Immunol*. 2005;2:92-100.
77. Riu E, Ferre T, Mas A, Hidalgo A, Franckhauser S, Bosch F. Overexpression of c-myc in diabetic mice restores altered expression of the transcription factor genes that regulate liver metabolism. *Biochem J*. 2002; 368:931-7.
78. Stienstra R, Duval C, Müller M, Kersten S. PPARs, Obesity, and Inflammation. *PPAR Res*. 2007; 2007:95974.

79. Qin X, Xie X, Fan Y, Tian J, Guan Y, Wang X, Zhu Y, Wang N. Peroxisome proliferator-activated receptor-delta induces insulin-induced gene-1 and suppresses hepatic lipogenesis in obese diabetic mice. *Hepatology*. 2008; 48:432-41.
80. Coll T, Barroso E, Alvarez-Guardia D, Serrano L, Salvadó L, Merlos M, Palomer X, Vázquez-Carrera M. The Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor beta/delta on the Inflammatory Basis of Metabolic Disease. *PPAR Res*. 2010; 2010.pii:368467.
81. Papachristou GI. Prediction of severe acute pancreatitis: current knowledge and novel insights. *World J Gastroenterol*. 2008; 14:6273-5.
82. Melgarejo E, Medina MA, Sánchez-Jiménez F, Urdiales JL. Monocyte chemoattractant protein-1: a key mediator in inflammatory processes. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009; 41:998-1001.
83. Kedage V, Muttigi MS, Shetty MS, Suvarna R, Rao SS, Joshi C, Prakash M. Serum paraoxonase 1 activity status in patients with liver disorders. *Saudi J Gastroenterol*. 2010;16:79-83.
84. Rull A, Escolà-Gil JC, Julve J, Rotllan N, Calpe-Berdiel L, Coll B, Aragonès G, Marsillach J, Alonso-Villaverde C, Camps J, Blanco-Vaca F, Joven J. Deficiency in monocyte chemoattractant protein-1 modifies lipid and glucose metabolism. *Exp Mol Pathol*.2007; 83:361-6.
85. Sears DD, Miles PD, Chapman J, Ofrecio JM, Almazan F, Thapar D, Miller YI. 12/15-lipoxygenase is required for the early onset of high fat diet-induced adipose tissue inflammation and insulin resistance in mice. *PLoS One*. 2009; 4(9):e7250.
86. Younce CW, Azfer A, Kolattukudy PE. MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1)-induced protein, a recently identified zinc finger protein, induces adipogenesis in 3T3-L1 pre-adipocytes without peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem*. 2009; 284:27620-8.