

Paper de la 2-ciclooxigenasa i la 5-lipooxigenasa en la inflamació hepàtica i del teixit adipós

Raquel Horrillo Saura

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 DE BARCELONA

Facultat de Medicina

PAPER DE LA CICLOOXIGENASA-2 I LA 5-LIPOOXIGENASA A LA INFLAMACIÓ HEPÀTICA I DEL TEIXIT ADIPÓS

Memòria presentada per

RAQUEL HERRILLO SAURA

per optar al títol de Doctora en Bioquímica

Treball realitzat sota la direcció del **Dr. Joan Clària Enrich**, al Servei de
Bioquímica i Genètica Molecular de l'Hospital Clínic de Barcelona

Raquel Herrillo Saura

Dr. Joan Clària Enrich
Director

Tesi inscrita en el programa de doctorat de Biopatologia en Medicina, del
Departament de Medicina, Facultat de Medicina, bienni 2005-2007

*Als meus pares,
la Sònia i el Joan*

ABREVIATURES

AA	Àcid araquidònic
ACC	Acetil-CoA carboxilasa
AGL	Àcids grassos lliures
AINE	Antiinflamatori no esteroïdal
AMP	Adenosina monofosfat
AMPC	AMP cíclic
AMPK	Quinasa dependent de AMP
ApoB	Apolipoproteïna B
ATP	Adenosina trifosfat
BSA	Albúmina de sèrum boví
CCR	Receptor de quimioquines C-C
ChREBP	Proteïna d'unió a l'element de resposta als carbohidrats
Cis-LT	Cisteïnil leucotriens
COX	Ciclooxigenasa
CPT-1	Carnitil palmitoil transferasa-1
CSF	Factor estimulator de colònies
DAB	Diaminobenzidina
DMEM	Medi d'Eagle modificat per Dulbecco
DNA	Àcid desoxiribonucleic
EIA	Assaig immunoenzimàtic
EtOH	Etanol
FASN	Sintasa d'àcids grassos
FBS	Sèrum fetal boví
FLAP	Proteïna activadora de la 5-LO
GLUT	Transportador de glucosa
H ₂ O _d	Aigua milliQ
HETEs	Àcids hidroxeicosatetraenoics
HIF	Factor inductor d'hipòxia
HPETEs	Àcids hidroperoxieicosatetraenoics
HSL	Lipasa sensible a hormones
ICAM	Molècula d'adhesió intercel·lular

Abreviatures

IGF	Factor de creixement depenent d'insulina
IL	Interleuquina
iNOS	Sintasa induïble de l'òxid nítric
IRS	Substrat del receptor d'insulina
JNK	Quinasa c-Jun N-terminal
LO	Lipooxigenasa
LPL	Lipoproteïna lipasa
LPS	Lipopolisacàrid
LTA ₄ H	LTA ₄ hidrolasa
LTC ₄ S	LTC ₄ sintasa
LTs	Leucotriens
MCP	Proteïna quimioatracent de monòcits
MeOH	Metanol
MIP	Proteïna inflamatòria dels macròfags
MMP	Metal·loproteïnasa
mRNA	RNA missatger
MTT	Bromur de 3-(4,5)-dimetiltiazolil-2,5-difeniltetraazoli
NF- κ B	Factor nuclear κ B
NK	<i>Natural Killer</i>
PAI	Inhibidor de l'activador del plasminògen
PBS	Solució tamponada amb fosfat
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de creixement derivat de plaquetes
PDK	Piruvat deshidrogenasa quinasa
PGES	PGE sintasa
PGs	Prostaglandines
PL	Fosfolipasa
PPAR	Receptor activat per proliferadors del peroxisoma
RBP	Proteïna d'unió al retinol
RNA	Àcid ribonucleic
ROS	Espècies reactives de l'oxigen
RP-HPLC	Cromatografia líquida d'alta resolució en fase reversa
RT-PCR	Retrotranscripció acoblada a la PCR

SAA	Sèrum amiloid A
SNC	Sistema nerviós central
SREBP	Proteïna d'unió a l'element de resposta als esterols
SVC	Cèl·lules vasculares de l'estroma
T ^a	Temperatura
TG	Triglicèrids
TGF	Factor de creixement transformant
TIMPs	Inhibidors tissular de metal·loproteïnases
TNF	Factor de necrosi tumoral
TX	Tromboxà
VCAM	Molècula d'adhesió cel·lular vascular
VEGF	Factor de creixement vascular endotelial
VLDL	Lipoproteïna de molt baixa densitat

ÍNDEX

INTRODUCCIÓ	1
I-Eicosanoids	1
1-Via de la ciclooxigenasa	2
2-Via de la 5-lipooxigenasa	6
3-Inhibidors i antagonistes de les vies de la COX-2 i la 5-LO	10
II-Inflamació hepàtica i malalties hepàtiques derivades	16
1-El sinusoides hepàtic	16
2-Resposta inflamatòria hepàtica	18
3-Fibrogènesi	19
4-Malaltia hepàtica grassa no alcohòlica	21
5-Efectes moduladors de les vies de la COX-2 i la 5-LO al fetge	24
III-Inflamació al teixit adipós i patologies associades	28
1-El teixit adipós	28
2-Canvis al teixit adipós durant l'obesitat	30
3-Origen de la inflamació al teixit adipós	32
4-Paper dels àcids grassos lliures	37
5-Influència del teixit adipós sobre les malalties hepàtiques	38
6-Efectes moduladors de les vies de la COX-2 i la 5-LO al teixit adipós	40
OBJECTIUS	43
RESULTATS	47
I- Article 1. Estudi comparatiu de la protecció en front de la inflamació i fibrosi hepàtica per un inhibidor selectiu de la COX-2 i un inhibidor de la 5-LO de tipus no redox.	49
<i>Comparative protection against liver inflammation and fibrosis by a selective COX-2 inhibitor and a nonredox-type 5-LO inhibitor.</i>	
<u>Horriillo, R., et al.</u> J. Pharmacol. Exp. Ther. 2007; 323: 778-786.	
II- Article 2. La proteïna activadora de la 5-lipooxigenasa modula la inflamació del teixit adipós i la disfunció lipídica en l'obesitat experimental.	63

5-Lipoxygenase activating protein signals adipose tissue inflammation and lipid dysfunction in experimental obesity.

Horrillo, R., et al. J. Immunol. 2010; 184: 3978-3987.

DISCUSSIÓ	79
CONCLUSIONS	91
BIBLIOGRAFIA	95
ANNEX I: Material i mètodes	121
I-Estudis <i>in vivo</i>	123
1-Model de inducció de inflamació i fibrosi hepàtica amb CCl ₄	123
2-Model de inducció a obesitat i esteatosi hepàtica amb dieta rica en greix	123
3-Administració de fàrmacs	123
4-Estudis experimentals	124
5-Test de tolerància a la glucosa	126
6-Test de sensibilitat a la insulina	126
II-Estudis <i>in vitro</i>	127
1-Experiments <i>ex vivo</i> amb explants de teixit adipós	127
1.1-Incubacions d'explants	127
2-Aïllaments d'adipòcits i cèl·lules vasculars de l'estroma (SVC)	129
2.1-Assaig d'entrada d'àcids grassos en adipòcits aïllats	130
2.1.1-Assaig fluorescent (QBT Fatty acid uptake)	130
2.1.2-Assaig radioactiu	131
3-Experiments amb adipòcits diferenciats 3T3-L1	132
4-Experiments amb macròfags Raw 264.7	133
4.1-Incubacions amb Raw 264.7	133
4.2-Assaig de viabilitat cel·lular	135
4.3-Protocol per al comptatge de cèl·lules viables	136
III-Tècniques histològiques	137
1-Determinació de la fibrosi hepàtica amb tinció Sirius Red	137

2-Determinació de l'apoptosi mitjançant l'assaig TUNEL	138
3-Detecció de macròfags positius per F4/80 per immunohistoquímica	139
4-Tinció dels lípids hepàtics mitjançant oil-red-O	140
IV-Determinacions proteiques	141
1-Extracció de proteïnes totals	141
2-Extracció de proteïnes nuclears	142
3-Quantificació de proteïnes	143
4-Determinació de l'activitat HSL i AMPK (Western blot)	143
5-Activitat NFκB	145
V-Anàlisi de l'expressió gènica	146
1-Extracció de RNA amb RNAqueous	146
2-Extracció de RNA amb Trizol	147
3-Retrotranscripció del RNA	148
4-PCR convencional	148
5-PCR a temps real	149
VI-Determinació d'eicosanoids	150
1-Extracció d'eicosanoids	150
2-Anàlisi d'eicosanoids per cromatografia líquida d'alta resolució en fase reversa (RP-HPLC)	151
3-Anàlisi d'eicosanoids per assaig immunoenzimàtic (EIA)	152
VII-Mètodes estadístics	152
VIII-Materials	153
<i>ANNEX II: Altres publicacions</i>	159
<i>ANNEX III: Presentacions a congressos</i>	163
<i>AGRAÏMENTS</i>	167

ÍNDIX TAULES

Taula 1: Receptors de prostanoids	5
Taula 2: Receptors de leucotriens	10
Taula 3: Compostos moduladors dels prostanoids	11
Taula 4: Inhibidors i antagonistes de la via de la 5-LO	14
Taula 5: Inhibidors duals	15
Taula 6: Adipoquines	30
Taula 7: Inhibidors i antagonistes usats	153
Taula 8: Medis de cultiu cel·lular	154
Taula 9: Tampons i solucions per a l'extracció de proteïnes i Western blot	155
Taula 10: Anticossos utilitzats per Western-blot i immunohistoquímica	156
Taula 11: Sondes per ratolí <i>Taqman Gene Expression Assays</i>	157
Taula 12: <i>Primers</i> i condicions utilitzats per les RT-PCR	158

ÍNDIX FIGURES

Figura 1: Via de la ciclooxigenasa	3
Figura 2: Via de la 5-lipooxigenasa	6
Figura 3: Regulació de la via de la 5-lipooxigenasa	8
Figura 4: Inhibició selectiva de la COX-2	12
Figura 5: El sinusoide hepàtic	17
Figura 6: Fisiopatologia de la fibrosi hepàtica	21
Figura 7: Estadis de la malaltia hepàtica grassa no alcohòlica	22
Figura 8: Influència del teixit adipós en altres òrgans	29
Figura 9: Alteracions del teixit adipós durant l'obesitat	31
Figura 10: Inflamació del teixit adipós durant l'obesitat	33
Figura 11: Macròfags al teixit adipós inflammat	35
Figura 12: Mecanismes d'acumulació de lípids al fetge	39

INTRODUCCIÓ

I-EICOSANOIDS

Els eicosanoids són una família de mediadors lipídics de inflamació generada a partir de l'oxidació de l'àcid araquidònic (20:4 ω 6), un àcid gras poliinsaturat de 20 carbonis alliberat dels fosfolípids de les membranes cel·lulars.

A més d'estar implicats a nombroses funcions biològiques d'homeòstasi, s'assumeix que aquests mediadors es formen i actuen a la iniciació i la resolució de la inflamació aguda i a la progressió de la inflamació crònica. De fet, sota condicions inflamatòries la velocitat de producció d'eicosanoids és elevada i s'observen nivells elevats a la sang i teixits a pacients amb malalties inflamatòries cròniques i agudes.

Als mamífers, la biosíntesi d'eicosanoids s'inicia habitualment per l'activació de la fosfolipasa (PL) A₂ i l'alliberament de l'àcid araquidònic des de la membrana de fosfolípids en resposta a una interacció d'un estímul amb la superfície cel·lular (Balsinde *et al.*, 2002). Les concentracions d'àcid araquidònic lliure intracel·lular són normalment molt baixes ja que aquest àcid gras és ràpidament metabolitzat per formar eicosanoids a través de dues rutes majoritàries: la via de la ciclooxigenasa (COX) i la de la lipooxigenasa (LO). A través d'aquestes vies es sintetitzen la major part dels eicosanoids biològicament actius com prostaglandines (PGs), tromboxà (TX), leucotriens (LTs), àcids hidroxieicosatetraenoics (HETEs) i lipoxines (Funk, 2001; Samuelsson *et al.*, 1987).

Normalment, els eicosanoids no són emmagatzemats a l'interior cel·lular sinó que són transportats a l'espai extracel·lular; i donat la seva poca estabilitat i vida mitja curta, exerceixen els seus efectes biològics al mateix lloc de la seva síntesi o a les cèl·lules properes (Funk, 2001).

1) Via de la ciclooxigenasa

La metabolització de l'àcid araquidònic per l'enzim COX dona lloc als prostanoids (és a dir PGs i TX) de la sèrie 2, sent les PGs els mediadors d'inflamació més àmpliament reconeguts (Vane i Botting, 1998). Els prostanoids exerceixen efectes directes sobre el múscul llis, les plaquetes, el sistema nerviós central i els òrgans endocrins, on desenvolupen funcions biològiques tant importants com el manteniment de l'homeòstasi cardiovascular, el manteniment de la funció gàstrica i renal, l'agregació plaquetària, la reproducció i la resposta immune (Miller, 2006).

La COX, o prostaglandina H sintasa, és una hemoproteïna de membrana formada per dos polipèptids idèntics de 70 kDa que funciona com un enzim bifuncional que porta a terme les dues primeres etapes de la biosíntesi de prostanoids (Figura 1). La primera és l'oxidació de l'àcid araquidònic per formar l'estructura cíclica PGG₂ (activitat ciclooxigenasa) i la segona és la peroxidació de la PGG₂ per originar l'endoperòxid PGH₂ (activitat peroxidasa). Es troba inserida a les membranes del reticle endoplasmàtic i del nucli amb el centre actiu orientat per captar l'àcid araquidònic que allibera la PLA₂.

Durant molts anys es va considerar que la COX era un únic enzim que s'expressava constitutivament a la majoria dels teixits, fins que al 1991 es van aportar les primeres evidències de l'existència de dues isoformes de la COX (COX-1 i COX-2) (Kujubu *et al.*, 1991; Xie *et al.*, 1991). Es considera que la COX-1 és una isoforma constitutiva que jugaria un paper clau al manteniment de les funcions homeostàtiques bàsiques, promouria la producció de les PGs bàsicament protectores i seria la forma predominant a la mucosa gàstrica i plaquetes (Clària, 2003; Morita, 2002). Per una altra banda, i amb excepcions com al ronyó i el sistema nerviós, la COX-2 és una isoforma que pot ser ràpidament induïda en presència de citokines o factors de creixement a les cèl·lules inflamatòries. Per tant, la isoforma COX-2 és aparentment

la responsable de la síntesi de les PGs involucrades a la resposta inflamatòria (Hla i Neilson, 1992; Otto i Smith, 1995).

La metabolització de la PGH_2 és altament específica del tipus cel·lular i està relacionada amb la funció biològica dels prostanoids PGE_2 , PGI_2 o prostaciclina, $PGF_{2\alpha}$, PGD_2 i el TXA_2 produïts per les sintases terminals (Funk, 2001; Samuelsson *et al.*, 1987). La PGE_2 es forma per l'enzim PGE sintasa (PGES) present virtualment a tots els tipus cel·lulars. S'han descrit tres PGES diferents (cPGES, mPGES-1 i mPGES-2), de les quals mPGES-1 va ser la primera en ser identificada i caracteritzada (Jakobsson *et al.*, 1999). Les prostaglandines, principalment la PGE_2 , juguen un paper al desenvolupament de la inflamació. La PGE_2 té un gran nombre d'efectes proinflamatoris que inclouen la inducció de la febre, l'increment de la permeabilitat vascular i la vasodilatació (Miller, 2006). A més, la PGE_2 sensibilitza les terminacions nervioses aferents i participa de forma sinèrgica amb altres mediadors de inflamació a la generació del dolor i l'edema (Miller, 2006).

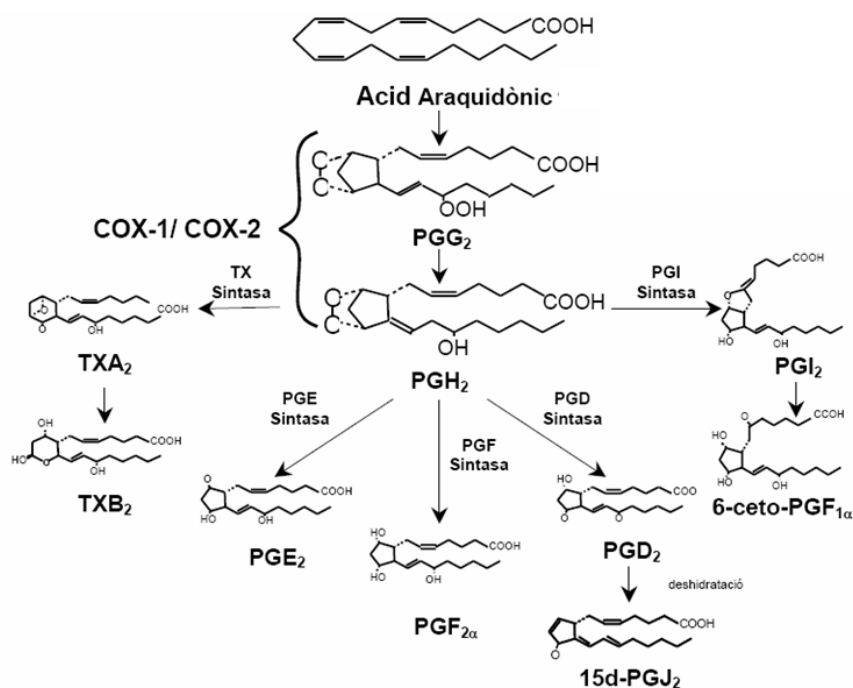


Figura 1: Via de la ciclooxygenasa. COX, ciclooxygenasa; PG, prostaglandina; TX, tromboxà.

La PGH_2 es transforma per les dues isoformes de la PGD sintasa (la H-PGD i la L-PGD) a PGD_2 (Funk, 2001) als mastòcits on està involucrada a la quimiotaxi i als processos al·lèrgics; i a les cèl·lules inflamatòries i l'úter es transforma per la PGF sintasa a $\text{PGF}_{2\alpha}$ amb efectes broncoconstrictors i a la reproducció.

Sobre la PGH_2 també actua la tromboxà sintasa que es troba a les plaquetes i forma el TXA_2 ; i la PGI sintasa de les cèl·lules endotelials vasculars per formar la PGI_2 o prostaciclina. Aquests compostos tenen funcions oposades a l'homeòstasi cardiovascular, ja que la PGI_2 és un relaxant del múscul vascular llis i inhibidor de l'agregació plaquetària, mentre el TXA_2 és vasoconstrictor i proagregant. Tant la PGI_2 com el TXA_2 són compostos inestables que s'hidrolitzen espontàniament a compostos sense activitat biològica ($6\text{-ceto-PGF}_{1\alpha}$ i TXB_2), per això actuen a prop del seu lloc de síntesi (Ohki *et al.*, 1979; Smith i Song, 2002).

La COX-2 i la síntesi de PGs tenen també un paper rellevant a la proliferació cel·lular i el desenvolupament del càncer. S'ha demostrat que la COX-2 es troba sobreexpressada a diversos tumors i que el consum regular dels antiinflamatoris no esteroïdals (AINEs) està associat amb un efecte antineoplàsic (Eberhart *et al.*, 1994; Thun *et al.*, 2002).

Per últim, la deshidratació no enzimàtica de les PGs produeix les PG ciclopentenones, sent les més rellevants des del punt de vista biològic les de la sèrie J_2 (PGJ_2 , $\Delta^{12}\text{-PGJ}_2$ i 15d-PGJ_2), totes elles derivades de la PGD_2 (Straus i Glass, 2001). Tenen propietats antiinflamatòries i la 15d-PGJ_2 és un lligand natural del PPAR_γ (Forman *et al.*, 1995; Gilroy *et al.*, 2004).

La primera acció dels eicosanoids és principalment a través de receptors acoblats a proteïna G, molts d'ells han estat clonats recentment, permetent el desenvolupament d'agonistes i antagonistes. Fins al moment, s'han descrit onze diferents tipus i subtipus de receptors de prostanoids, els quals de la mateixa manera que les sintases responsables de la

seva síntesi, s'expressen de manera específica a cada un dels teixits i tipus cel·lulars (Breyer *et al.*, 2001; Clària i López-Parra, 2005; Funk, 2001). A la taula 1 es detallen els receptors específics per cada prostanoid i la seva localització (FitzGerald, 2003).

Taula 1: Receptors de prostanoids

<i>Prostanoid</i>	<i>Receptor</i>	<i>Localització</i>
PGE ₂	EP ₁ , EP ₂ , EP ₃ , EP ₄	Endoteli, ronyó, plaquetes, cervell
PGD ₂	DP ₁ , DP ₂	Mastòcits, cervell, vies respiratòries, cèl·lules del múscul llis, plaquetes
PGF _{2α}	FP _α , FP _β	Úter, vies respiratòries, cèl·lules del múscul llis, ull
TXA ₂	TP _A , TP _B	Plaquetes, cèl·lules del múscul llis vascular, macròfags, ronyó
PGI ₂	IP	Endoteli, ronyó, plaquetes, cervell

La majoria d'aquests receptors estan acoblats a l'activació de proteïna G, encara que el mecanisme de transducció de senyal és característic de cada un d'ells. Per exemple, la unió al IP, DP₁, EP₂ i EP₄ produeix un increment dels nivells intracel·lulars de AMPc i la unió als EP₁, FP i TP comporta la formació d'inositol trifosfat, resultant les dues vies en un augment intracel·lular de calci (Breyer *et al.*, 2001). En canvi, la unió al receptor EP₃ disminueix la formació de AMPc.

A part d'unir-se a receptors plasmàtics, certes PGs actuen com a lligands de receptors nuclears com els PPARs, els quals modulen gens associats a la inflamació, la proliferació cel·lular, l'apoptosi i la diferenciació (Evans *et al.*, 2004).

2) Via de la 5-lipooxigenasa

La via de les LOs agrupa a una família de dioxigenases que transformen l'àcid araquidònic en HETEs, LTs i lipoxines (Funk *et al.*, 2001; Samuelsson *et al.*, 1987) (Figura 2). Als humans existeixen tres LOs diferents: 5-LO, 12-LO i 15-LO, les quals incorporen oxigen molecular als carbonis 5, 12 o 15 de l'àcid araquidònic, formant 5, 12- i 15-HETE, respectivament (Brash, 1999).

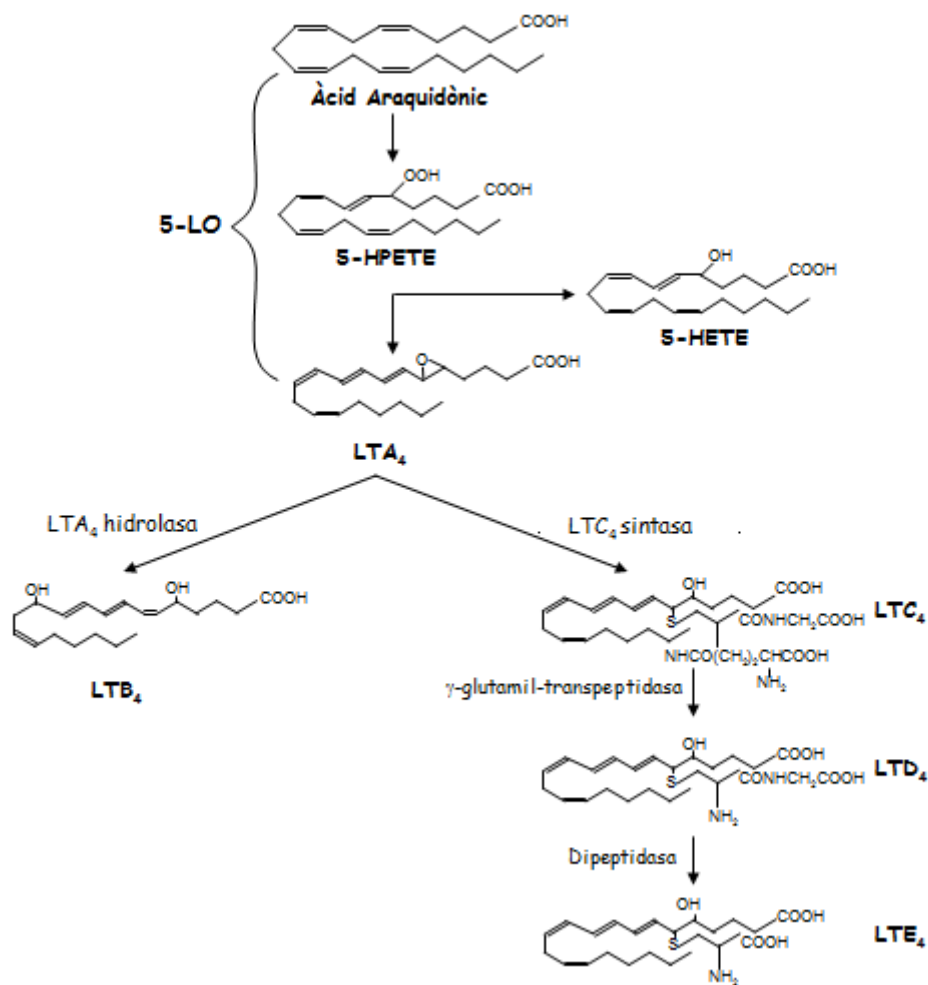


Figura 2: Via de la 5-lipooxigenasa. HETE, àcid hidroxieicosatetraenoic; HPETE, àcid hidroperoxieicosatetraenoic; LT, leucotriè; LO, lipooxigenasa.

La via de la 5-LO representa una de les vies proinflamatòries més importants de l'organisme al ser la responsable de la síntesi de leucotriens; aquests són produïts

majoritàriament per les cèl·lules inflamatòries com els leucòcits polimorfonuclears, els neutròfils, els eosinòfils, els macròfags, els mastòcits, les cèl·lules dendrítiques i els limfòcits (Funk *et al.*, 2001; Lewis *et al.*, 1990; Samuelsson *et al.*, 1987). Els productes d'aquesta via estan involucrats a malalties inflamatòries agudes i cròniques, com l'asma, la rinitis, l'artritis reumatoide, l'osteoartritis i l'aterosclerosi (Lewis *et al.*, 1990; Peters-Golden i Henderson, 2007; Romano i Clària, 2003).

La inducció de la biosíntesi de leucotriens succeeix en resposta a un conjunt de senyals inflamatòries i immunològiques que mobilitzen el calci intracel·lular, tal com els complexos immunes, els pèptids bacterians i altres estímuls. Això promou la fosforilació de la PLA₂ i de la 5-LO i la translocació d'aquests dos enzims del citosol a la membrana nuclear; on la 5-LO interacciona amb la proteïna activadora de la 5-LO (FLAP), necessària per a la producció de leucotriens (Dixon *et al.*, 1990).

La 5-LO és una dioxigenasa amb ferro no-hemo que catalitza els dos primers passos en la biosíntesi de LTA₄, primer oxida l'àcid araquidònic a la posició C5 per formar el 5-HPETE i després el deshidrata per formar el LTA₄ (Rouzer *et al.*, 1986; Shimizu *et al.*, 1984). El 5-HPETE pot ser a més reduït a 5-HETE. La 5-LO està regulada a diferents nivells; la translocació de la 5-LO del citosol a la membrana nuclear està regulada per els nivells intracel·lulars de Ca²⁺ i per interaccions amb la proteïna d'unió a actina CLP (*coactosin like protein*) (Rakonjac *et al.*, 2006); i la seva activitat per ATP, fosfatidilcolina, la FLAP i fosforilació al domini catalític (Figura 3).

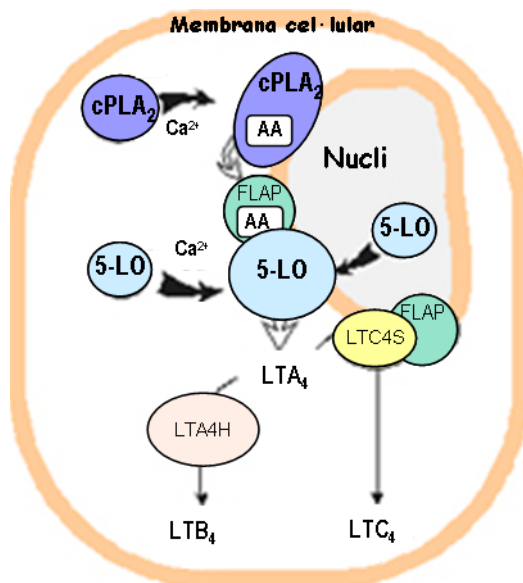


Figura 3: Regulació de via de la 5-lipooxigenasa. AA, àcid araquidònic; FLAP, proteïna activadora de la 5-LO; LT, leucotriè; LO, lipooxigenasa; PL, fosfolipasa.

La proteïna FLAP és una proteïna de membrana nuclear integral sense cap activitat enzimàtica coneguda però capaç d'activar la 5-LO. Es va descobrir mitjançant l'inhibidor MK886, que podia disminuir la síntesi de leucotriens i s'unia a una proteïna identificada mitjançant cromatografia d'afinitat (Mancini *et al.*, 1993). La FLAP és capaç d'associar la 5-LO a la membrana i presentar l'àcid araquidònic al centre actiu de la 5-LO (Woods *et al.*, 1993). Encara que no es coneix clarament com la FLAP activa la 5-LO, sembla que estimula l'enzim i potencia la formació relativa de LTA₄ en front de 5-HPETE (Plante *et al.*, 2006).

El LTA₄ és un epòxid al·lílic inestable que es pot transformar de més de tres maneres diferents depenent del context cel·lular: per hidròlisi, conjugació amb glutatió o metabolisme transcel·lular per generar eicosanoids bioactius (Figura 2) (Gronert *et al.*, 1999).

A través d'una epoxi-hidrolasa específica citoplasmàtica, la LTA₄ hidrolasa (LTA4H), es catalitza la conversió de LTA₄ a LTB₄ (Radmark *et al.*, 1984). El LTB₄, produït principalment per leucòcits, neutròfils, monòcits i macròfags, és un dels mediadors quimiotàctics més potents i

representa un potencial nexa entre les reaccions de la immunitat innata i adaptada; indueix l'adhesió cel·lular a l'endoteli i incrementa la permeabilitat vascular. A més, indueix l'alliberament d'enzims lisosòmics i potencia la generació d'espècies reactives d'oxigen (ROS) i citoquines proinflamatòries (Funk, 2001; Lewis *et al.*, 1990; Samuelsson *et al.*, 1987).

La LTC₄ sintasa (LTC₄S) és una proteïna integral de membrana regulada per fosforilació, que realitza la reacció de conjugació entre l'epòxid LTA₄ i el glutatió per produir LTC₄. El LTC₄ pot ser alliberat al medi extracel·lular i perdre residus aminoacídics mitjançant dos passos successius amb els enzims γ -glutamiltanspeptidasa i dipeptidasa per generar LTD₄ i LTE₄. El LTC₄, LTD₄ i LTE₄ s'anomenen genèricament com cisteïnil-LT (cis-LT) i originalment eren coneguts com les substàncies de reacció lenta alliberades durant l'anafilaxi (Lewis *et al.*, 1990). Els mastòcils, basòcils i eosinòcils són els principals productors de cis-LTs, que són mediadors potents a les reaccions al·lèrgiques i d'hipersensibilitat. Són agents quimioatracients pels eosinòcils, incrementen la permeabilitat vascular i indueixen la síntesi i alliberament d'altres mediadors d'inflamació. A més, tenen un paper clar a les malalties respiratòries, ja que són broncoconstrictors, i indueixen l'edema pulmonar i la secreció mucosa (Henderson, 1994; Samuelsson, 1983).

Alternativament, la interacció entre varies LOs (per exemple entre la 5- i la 12-LO o bé entre la 15- i la 5-LO) mitjançant metabolisme transcel·lular dóna lloc a la síntesi de lipoxines, un grup d'eicosanoids amb particulars propietats antiinflamatòries que promouen la resolució de la resposta inflamatòria aguda (Serhan, 2002).

Els leucotriens, un cop sintetitzats i alliberats al medi extracel·lular, realitzen les seves accions bioactives a través de receptors acoblats a proteïna G_q. Fins al moment s'han trobat quatre receptors per als LTs, dos per al LTB₄ (LTB-1 i LTB-2 reconeixen el LTB₄ amb alta i baixa

afinitat, respectivament) i dos per als cis-LTs (Heise *et al.*, 2000; Lynch *et al.*, 1999; Yokomizo *et al.*, 1997, 2000) (Taula 2).

Taula 2: Receptors dels leucotriens

<i>Leucotriè</i>	<i>Receptor</i>	<i>Localització</i>
LTB ₄	LTB-1, LTB-2	Leucòcits i cèl·lules inflamatòries, constitutiu
LTC ₄ LTD ₄ LTE ₄	CisLT-1, CisLT-2	Cèl·lules endotelials vasculars, cèl·lules del múscul llis, vies respiratòries, cèl·lules inflamatòries, melsa, cor, glàndula adrenal

Recentment s'ha descrit el receptor OXE, acoblat a proteïna G_i i que reconeix 5-HETE i el seu producte d'oxidació, 5-oxo-EETE (Hosoi *et al.*, 2002; Powell *et al.*, 2005); i un receptor putatiu que reconeix un metabòlit del 5-oxo-EETE, FOG₇ (Bowers *et al.*, 2000). Aquests receptors podrien estar involucrats a al·lèrgies o asma.

3) Inhibidors i antagonistes de la via de la 5-LO i la COX-2

Degut a que les vies de la COX i la 5-LO estan implicades directament a la inflamació, la seva inhibició representa la major diana en el tractament dels desordres inflamatoris (Fitzgerald i Patrono, 2001). La caracterització i cristal·lització dels enzims i receptors d'aquestes vies ha permès el desenvolupament de compostos que interfereixen directament a la formació de PGs i LTs: inhibidors, agonistes i antagonistes. Alguns d'aquests compostos han mostrat utilitats terapèutiques i es comercialitzen per al tractament de malalties inflamatòries. Altres han estat descartats per els seus efectes secundaris i s'utilitzen actualment per investigació *in vitro* (Clària i López-Parra, 2005).

Les accions dels productes de la via de la COX són modulades per els compostos antiinflamatoris no esteroïdals (AINEs), els inhibidors selectius de la COX-2 (coxibs), i per agonistes i antagonistes dels receptors de prostanoids. Alguns d'aquests compostos es detallen a la taula 3.

Taula 3: Compostos moduladors dels prostanoids

<i>Inhibidors COX-1/2</i>	
Àcid acetilsalicílic	Indometacina
Ibuprofèn	Diclofenac
Naproxèn	
<i>Inhibidors COX-2</i>	
Celecoxib	Etodolac
Rofecoxib	Nimesulide
Etoricoxib	NS-389
Parecoxib	CGP-28238
Valdecoxib	DuP-697
Lumiracoxib	DFU
Meloxicam	
<i>Agonistes i antagonistes dels receptors</i>	
Misoprostol	Iloprost
Alprostadil	AA-2114
Fluprotenol	BAY-U-3405

La via de la COX ofereix un gran nombre d'oportunitats terapèutiques, especialment en el camp de la inflamació degut a que aquesta via representa la diana principal dels AINEs. Els AINEs són els fàrmacs més àmpliament prescrits, sent utilitzats en el tractament del dolor, la febre i la inflamació, encara que l'administració a llarg termini té efectes secundaris gastrointestinals (Vane i Botting, 1998). Aquests efectes poden ser associats a la inhibició de les dues isoformes de la COX, ja que clàssicament s'associa que les prostaglandines derivades de la

COX-1 estan involucrades en les funcions homeostàtiques com la protecció gastrointestinal i les derivades de la COX-2 estan implicades a la inflamació.

L'àcid acetilsalicílic és l'únic membre d'aquesta classe de compostos amb un mecanisme d'acció únic acetilant covalentment la COX. Això bloqueja l'accés de l'àcid araquidònic al centre actiu per la producció de prostaglandines i possibilita la formació de les antiinflamatòries 15-epi-lipoxines (Clària i Serhan, 1995).

Les estructures cristal·lines de la COX-1 i la COX-2 són similars a excepció d'un aminoàcid que fa que el centre actiu de la COX-2 sigui més ampli; aquest fet ha possibilitat que es desenvolupin compostos sintètics que bloquegen específicament la COX-2 (coxibs) per no tenir efectes adversos gastrointestinals (Figura 4). De fet, després del descobriment de la COX-2 es va trobar que alguns dels AINEs exercien el seu efecte bloquejant majoritàriament aquesta isoforma i això explicava el seu perfil diferencial d'efectes (FitzGerald, 2003; Smith *et al.*, 2000).

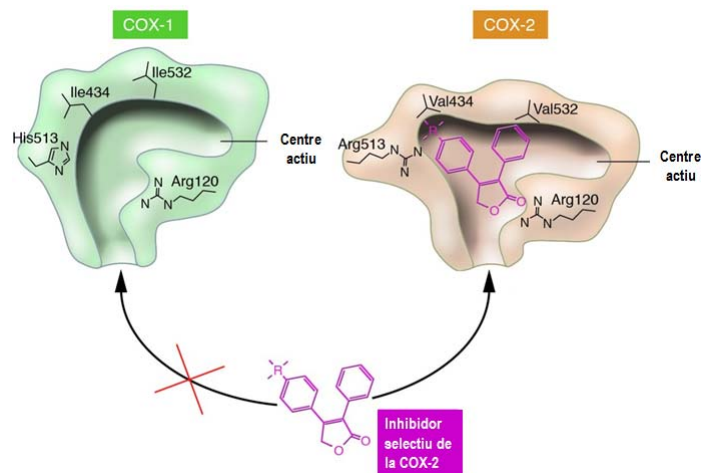


Figura 4: Inhibició selectiva de la COX-2. COX, ciclooxygenasa. (Figura adaptada de Grosser *et al.*, 2006).

Els coxibs tal com el celecoxib i el rofecoxib han estat usats clínicament en el tractament de l'artritis i el dolor sense estar associats a l'aparició d'úlceres gàstriques (FitzGerald i Patrono, 2001). Una segona generació de coxibs han estat aprovats per al tractament de l'osteoartritis,

l'artritis reumatoide, la dismenorrea i el dolor postoperatori (Clària i López-Parra, 2005) i actualment s'estan realitzant assaigs clínics amb coxibs per al tractament de diversos càncers. No obstant, el rofecoxib s'ha retirat del mercat perquè suposa un risc per a pacients amb problemes cardiovasculars. Aquest efecte pot estar associat a un desequilibri en la ràtio d'inhibició dels prostanoids PGI_2 i TXA_2 , produint un efecte net d'agregació plaquetària i vasoconstricció (FitzGerald, 2003).

Diversos agonistes i antagonistes sintètics dels receptors de prostanoids són utilitzats com a teràpia farmacològica per al tractament del dany gàstric, el glaucoma, la disfunció erèctil, la hipertensió pulmonar i l'asma; i s'estan estudiant en el tractament del dolor, la trombosi, l'osteoporosi i el part prematur (Clària i López-Parra, 2005; Narumiya i FitzGerald, 2001).

Durant els últims 25 anys s'han desenvolupat un gran nombre de fàrmacs que tenen com a diana específica la via de la 5-LO. Aquests fàrmacs interfereixen a la síntesi o l'efecte dels leucotriens amb la conseqüent disminució de la quimiotaxi i permeabilitat vascular. Els compostos moduladors d'aquesta via, descrits a la taula 4, exerceixen el seu efecte mitjançant la inhibició dels enzims (5-LO, FLAP i LTA4H) o antagonitzant els receptors (LTB-1/2 i CisLT-1/2).

En particular, és important destacar que inhibidors de la 5-LO (zileuton) i agonistes del CisLT-1 (montelukast, zafirlukast i pranlukast) es prescriuen actualment per al tractament de l'asma crònic i la rinitis (Drazen *et al.*, 1999). En nombrosos assaigs clínics, antagonistes dels receptors dels CisLT-1 han demostrat millora a la funció pulmonar i la reducció d'exacerbacions de l'asma (Nathan i Kemp, 2001).

Taula 4: Inhibidors i antagonistes de la via de la 5-LO

<i>Inhibidors de la 5-LO</i>	
Zilueton	BW-775C
NDGA	L-656,224
Àcid cafeic	ZD-2138
AA-861	CJ-13,610
<i>Inhibidors de la FLAP</i>	
Bay-X-1005	MK-886
AM-103	MK-0591
GSK-2190915	
<i>Antagonistes dels receptors</i>	
Montelukast	Etalocib
Zafirlukast	SC-41930
Pranlukast	CP-105,696

Per una altra banda, la inhibició de la 5-LO podria tenir efectes beneficiosos sobre les malalties cardiovasculars donat que estudis de lligament genètic han demostrat que el gen que codifica per la FLAP confereix un major risc d'infart (Helgadottir *et al.*, 2004). En aquest sentit, un estudi clínic en fase III ha demostrat que l'inhibidor de la FLAP, DG-031 o Bay-X-1005, és eficaç per la prevenció d'atacs de cor i accidents vasculars en pacients d'alt risc (Hakonarson *et al.*, 2005). A més, actualment s'estan realitzant assaigs clínics amb diversos inhibidors de la LTA₄ hidrolasa per al tractament de l'infart de miocardi (Davies *et al.*, 2009). Per últim, antagonistes del LTB-1 s'estan estudiant per la seva potencial modulació de l'aterosclerosi, l'artritis, la inflamació pulmonar i el càncer pancreàtic (Hicks *et al.*, 2007).

Donat que la COX i la 5-LO tenen funcions convergents a la inflamació, durant els últims anys, s'han desenvolupat inhibidors duals COX/5-LO (taula 5). Aquests compostos formen interaccions específiques amb el centre actiu d'ambdós enzims, encara que la COX i la 5-LO no

comparteixen similituds estructurals. Aquests inhibidors poden exercir un efecte antiinflamatori exempt dels efectes secundaris gastrointestinals i cardiovasculars. Per exemple, es coneix que els inhibidors de la COX indueixen reaccions adverses a pacients asmàtics potser degut a la derivació de l'àcid araquidònic cap a la síntesi de leucotriens (Fiorucci *et al.*, 2001). D'aquesta manera, aquests compostos tindrien en teoria un perfil superior en el tractament dels desordres inflamatoris com l'artritis, osteoartritis, asma i malalties inflamatòries intestinals (Clària i López-Parra, 2005).

Licofelone és el fàrmac d'aquesta categoria més desenvolupat havent-se realitzat estudis clínics per al tractament de l'osteoartritis (Raynauld *et al.*, 2009). Aquest fàrmac té propietats analgèsiques, antiinflamatòries, antipirètiques, antibroncoconstrictores i antitrombòtiques a dosis segures per el tracte gastrointestinal (Celotti i Durand, 2001).

Taula 5: Inhibidors duals

<i>Inhibidors duals COX/5-LO</i>
Licofelone
Tepoxalin
RWJ-63556
ER-34122
S-2474

II-INFLAMACIÓ HEPÀTICA I MALALTIES HEPÀTIQUES ASSOCIADES

A tots els teixits del nostre organisme, la inflamació és la primera reacció en front a qualsevol agressió provocada per agents externs (físics, químics o biològics) que provoquen una lesió tissular. Encara que, la finalitat de la resposta inflamatòria és la restauració de l'estructura i la funció del teixit afectat, quan la causa del dany tissular és crònica, per que no es pot eliminar o no està controlada, la resposta inflamatòria està permanentment activada i es transforma en un procés crònic que produeix un dany excessiu als teixits. En el cas concret del fetge, la lesió cel·lular es manifesta principalment amb la mort dels hepatòcits. Quan el dany hepàtic és limitat, per exemple després d'una hepatitis aguda, es produeix una ràpida resposta regenerativa dels hepatòcits que substitueixen el teixit afectat i es restableix l'arquitectura hepàtica normal. No obstant, quan l'agent nociu actua de manera persistent i l'acció sobrepassa la capacitat hepàtica de defensa i reparació, es produeix una resposta caracteritzada per una regeneració cel·lular desordenada i el desenvolupament d'inflamació i fibrosi (Malhi *et al.*, 2006; Rodés *et al.*, 2007). L'aparició del dany hepatocel·lular és un fet comú a gairebé totes les hepatopaties cròniques; i es pot produir per múltiples factors entre els que destaquen els virus, l'alcohol, malalties autoimmunes, la colestasi crònica, desordres metabòlics o defectes genètics. No obstant la seva patogènia varia específicament segons l'agent etiològic (Malhi *et al.*, 2006; Rodés *et al.*, 2007).

1) El sinusoides hepàtic

El sinusoides hepàtic constitueix la unitat estructural funcional del fetge on es troben tots els tipus cel·lulars; en aquest, les cèl·lules parenquimals o hepatòcits es distribueixen formant passadissos molt estrets per els quals la sang flueix a través del fetge (Figura 5). Els hepatòcits són les cèl·lules majoritàries al fetge representant més del 80% del volum hepàtic. Les altres

cèl·lules presents, les no parenquimals, comprenen les cèl·lules de Kupffer, les hepàtiques estelades, les endotelials sinusoidals i les citotòxiques *natural killer* (NK). Les cèl·lules hepàtiques estelades es troben al subespai endotelial anomenat espai de Disse, entre els hepatòcits i les cèl·lules endotelials sinusoidals. Aquestes cèl·lules estelades es caracteritzen per emmagatzemar vitamina A a les gotes lipídiques perinuclears. Les cèl·lules de Kupffer són els macròfags residents del fetge i les principals responsables de la defensa en aquest òrgan. Aquestes es localitzen al lumen sinusoidal a sobre les cèl·lules endotelials, emetent prolongacions citoplasmàtiques a l'espai de Disse subendotelial. D'aquesta manera poden estar en contacte directe amb les cèl·lules estelades i els hepatòcits. Les cèl·lules endotelials també es localitzen al lumen sinusoidal i formen la paret fenestrada dels sinusoides, contribuint al ràpid transport de soluts a través de l'espai subendotelial. Les cèl·lules NK del fetge, anomenades també *pit cells*, es troben al lumen sinusoidal i són limfòcits granulars amb gran activitat citotòxica (Clària i Titos, 2004; Friedman, 2000; Laskin, 1990).

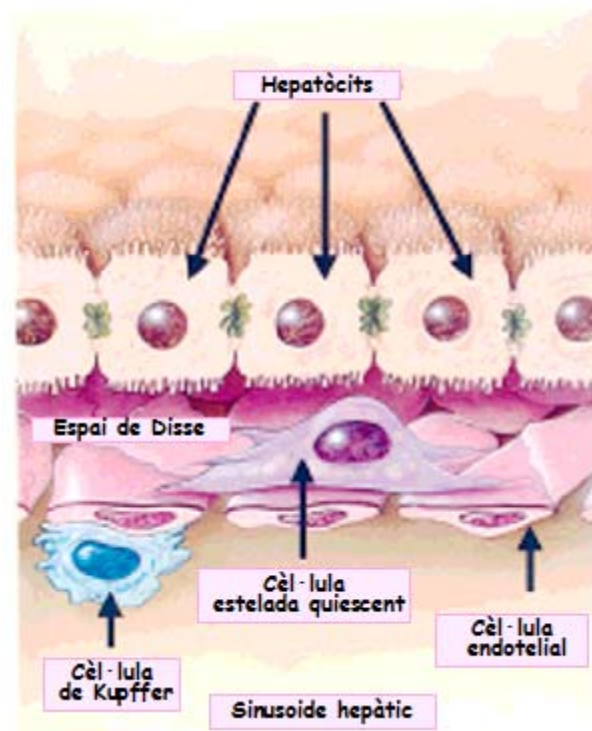


Figura 5: El sinusoides hepàtic. (Figura adaptada de Friedman, 2000).

De les cèl·lules no parenquimals, les cèl·lules de Kupffer, les endotelials, i les NK exerceixen les funcions de defensa cel·lular per tot l'organisme i el fetge. Les cèl·lules de Kupffer presenten una superfície cel·lular amb nombrosos microvil·lis i invaginacions que semblen estar implicades a la fagocitosi; d'aquesta manera eliminen de la circulació sanguínia les partícules estranyes, innecessàries o alterades (Munthe-Kaas, 1976; Wisse, 1974). Les cèl·lules de Kupffer actuen també com a cèl·lules presentadores d'antigen, activant la resposta immunitària derivada dels limfòcits T (Van Bossuyt i Wisse, 1988; Rogoff i Lipsky, 1981).

2) Resposta inflamatòria hepàtica

Entre els mecanismes implicats al desenvolupament de la lesió hepàtica els més reconeguts són els següents: l'activació de les cèl·lules de Kupffer i el reclutament de les cèl·lules inflamatòries (neutròfils, leucòcits i monòcits); l'aparició d'estrès oxidatiu degut a la formació de ROS; la producció de citoquines, com IL-1, IL-6, IL-10, $TNF\alpha$ i $TGF\beta$, i l'alliberació de mediadors lipídics d'inflamació derivats de l'àcid araquidònic (Clària i Titos, 2004; Decker, 1985; Pestel *et al.*, 2002; Planagumà *et al.*, 2002; Winwood i Arthur, 1993).

El dany hepàtic està típicament associat amb la infiltració de cèl·lules inflamatòries, però encara que no hi siguin, el fetge conté suficients cèl·lules de Kupffer i NK per iniciar la inflamació local abans de l'arribada de les cèl·lules extrahepàtiques. Les cèl·lules de Kupffer activades modifiquen els processos metabòlics claus a les cèl·lules parenquimatoses, com l'alliberació d'albumina per els hepatòcits, cosa que altera la funció hepàtica i contribueix al desenvolupament de lesió a aquest òrgan (Winwood i Arthur, 1993); i a més, juguen un paper important amb l'alliberament de ROS i citoquines (Naito *et al.*, 2004).

Les cèl·lules endotelials sinusoidals, que normalment estan fenestrades per permetre el transport ràpid bidireccional de soluts entre la sang sinusoidal i les cèl·lules parenquimals,

poden perdre aquestes fenestracions com a conseqüència del dany i expressar molècules proinflamàtores com ICAM-1, VEGF i molècules d'adhesió (que permetran el reclutament i la transmigració al sinusoides de més cèl·lules inflamatòries). L'estrès oxidatiu causat per l'activació de les cèl·lules de Kupffer té com a conseqüència la necrosi hepatocitària, i aquest fet produeix l'activació de les cèl·lules estelades i la subseqüent fibrosi (Friedman, 2000).

3) Fibrogènesi

Després d'un dany agut, la reacció inflamatòria i el procés de remodelació de la matriu a través de síntesi i degradació de fibra porten a la recuperació de l'arquitectura normal del fetge: les cèl·lules del parènquima es regeneren i reemplacen les cèl·lules necròtiques i apoptòtiques. No obstant, quan el dany hepàtic és crònic i existeix un procés d'inflamació prolongada i descontrolat, la regeneració falla i els hepatòcits són substituïts per matriu extracel·lular (Friedman, 2006). Diversos estudis, tant en pacients com en models animals, correlacionen l'activitat inflamatòria amb la fibrosi (Constandinou *et al.*, 2005; Ludwig *et al.*, 1980; Sorensen *et al.*, 1984; Tsukamoto *et al.*, 1990). Aquesta inflamació crònica porta a l'acumulació progressiva de proteïnes de matriu extracel·lular, com col·làgens, proteoglicans i glicoproteïnes, que indueixen canvis qualitius a la composició de la matriu extracel·lular formant xarxes molt resistents a la fibròlisi.

A tots els teixits, el component fibròtic del procés de dany-reparació al fetge està mediat per miofibroblastes i en el cas del fetge són derivats a partir de les cèl·lules hepàtiques estelades (Geerts, 2001). L'estrès oxidatiu i l'activació de les cèl·lules de Kupffer activen les cèl·lules hepàtiques estelades de manera que adquireixen un fenotip proliferatiu, contràctil, fibrogènic i inflamatori (Friedman *et al.*, 1985). Les cèl·lules hepàtiques estelades activades perden els seus grànuls de vitamina A, proliferen, migren i s'acumulen a les àrees de necrosi

hepatocitària, on es produeixen citoquines proinflamàtores i sintetitzen una gran varietat de proteïnes de matriu extracel·lular i TIMPs, evitant que es degradin les proteïnes de matriu (Friedman i Arthur, 1989; Matsuoka i Tsukamoto, 1990; Shiratori *et al.*, 1986).

La presència de matriu extracel·lular fibril·lar a l'espai de Disse té conseqüències per a la funció hepàtica, donant la pèrdua de microvil·li dels hepatòcits i la fenestració endotelial, es a dir, la pèrdua de l'arquitectura tissular normal que interfereix a la funció de l'òrgan (Friedman, 2000).

Un dels factors més profibròtics alliberats per els macròfags és el TGF β -1, que promou l'expressió de col·lagen 1 a les cèl·lules estelades, la seva activació i transició al fenotip miofibroblàstic i la inhibició de la degradació de la matriu cel·lular a través de la inducció de TIMPs. L'angiotensina II, el PDGF, el TNF α i la leptina alliberades també activen les cèl·lules estelades (Iredale, 2007).

En conjunt, els canvis fenotípics a les cèl·lules hepàtiques estelades indueixen la fibrogènesi i l'acumulació progressiva de teixit cicatritzant al voltant dels hepatòcits amb la finalitat de reparar els danys al teixit (Bataller i Brenner, 2005; Friedman, 2006).

La fibrosi hepàtica és un procés dinàmic amb respecte a les modificacions, recanvi i degradació de la matriu extracel·lular: si la causa del dany hepàtic és eliminada, la fibrosi es resol i es torna a l'arquitectura hepàtica normal. Aquesta fase inclou l'apoptosi o el retorn a fenotip quiescent de les cèl·lules hepàtiques estelades activades i la regeneració dels hepatòcits. La regressió de la fibrosi es dona en paral·lel amb la disminució del TIMP-1, i la degradació conseqüent de la matriu extracel·lular. A més, s'ha trobat que els macròfags també poden promoure l'apoptosi de les cèl·lules estelades i la regressió de la fibrosi (Duffield *et al.*, 2005). De fet, diversos estudis en pacients i rates han demostrat que la fibrosi avançada, inclòs

la cirrosi es pot revertir després d'haver-se controlat l'estímul nociu (Figura 6) (Dienstag *et al.*, 2003; Duchatelle *et al.* 1998; Hammel *et al.*, 2001; Iredale *et al.*, 1998).

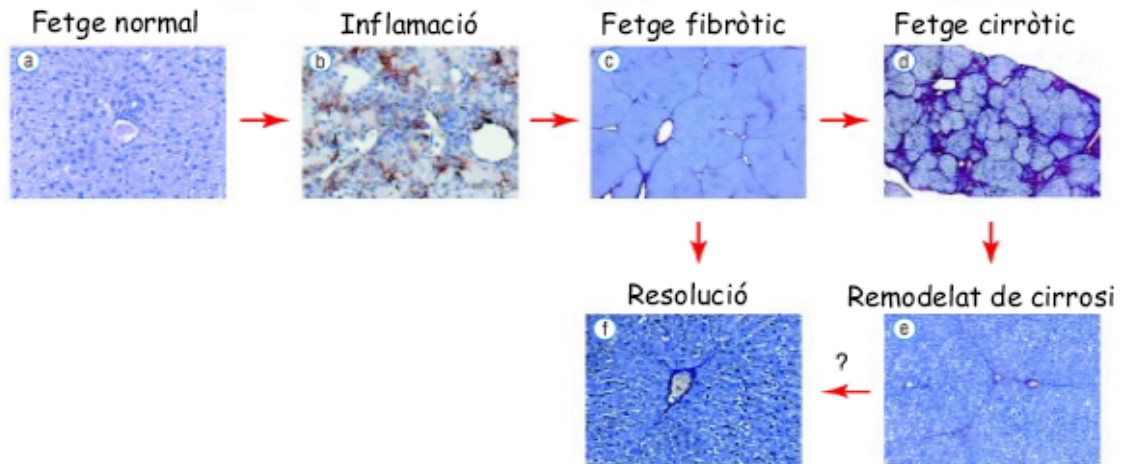


Figura 6: Fisiopatologia de la fibrosi hepàtica. (Figura adaptada de Iredale, 2003).

La fibrosi hepàtica produïda per l'estat inflamatori descontrolat pot evolucionar cap a la cirrosi (Friedman, 2006; Lotersztajn *et al.*, 2005), que es caracteritza per la pèrdua completa de l'arquitectura normal del fetge, amb la formació de septes fibròtics que envolten els nòduls d'hepatòcits en regeneració. La cirrosi és un problema greu de salut pública a tot el món degut a que les seves complicacions, com la hipertensió portal, la fallida hepàtica i l'alt risc de desenvolupar carcinoma hepatocel·lular; i sovint requereix trasplantament hepàtic (Ginés *et al.*, 2004; Lotersztajn *et al.*, 2005).

4) Malaltia hepàtica grassa no alcohòlica

La malaltia hepàtica grassa no alcohòlica és un terme que engloba un espectre de patologies diverses molt similars a les induïdes per l'alcohol, però que afecten als individus que no abusen d'aquesta substància. Aquesta malaltia comprèn des de l'acumulació simple de triglicèrids (TG) als hepatòcits (esteatosis hepàtica), l'esteatosis amb inflamació (esteatohepatitis), la fibrosi, la cirrosi i el carcinoma hepatocel·lular (Neushwander-Teri i Caldwell, 2003). Està

associada a l'obesitat i la resistència a la insulina, per el que es considera com la manifestació hepàtica del síndrome metabòlic. La malaltia hepàtica no alcohòlica afecta del 20 al 30% de la població als països occidentals, on és la major causa de malaltia hepàtica crònica (Angulo, 2002; Browning i Horton, 2004; Day, 2006).

El primer estadi d'aquesta malaltia, l'esteatosi hepàtica, es considera que és una condició benigna i sense conseqüències adverses inflamatòries o de mort cel·lular; en canvi un cop adquireix el component inflamatori, l'esteatohepatitis pot progressar fins a l'estat final de la malaltia hepàtica (Figura 7).

Els principals factors de risc per al desenvolupament de l'esteatosi no alcohòlica és l'obesitat visceral, inclòs a pacients amb un índex de massa corporal normal; la diabetis tipus 2, que accentua la severitat d'aquesta malaltia; i la dislipèmia, concretament la hipertriglicèmia més que la hipercolesterolèmia. A més, s'ha observat que és una malaltia amb un elevat component hereditari (Angulo, 2002).

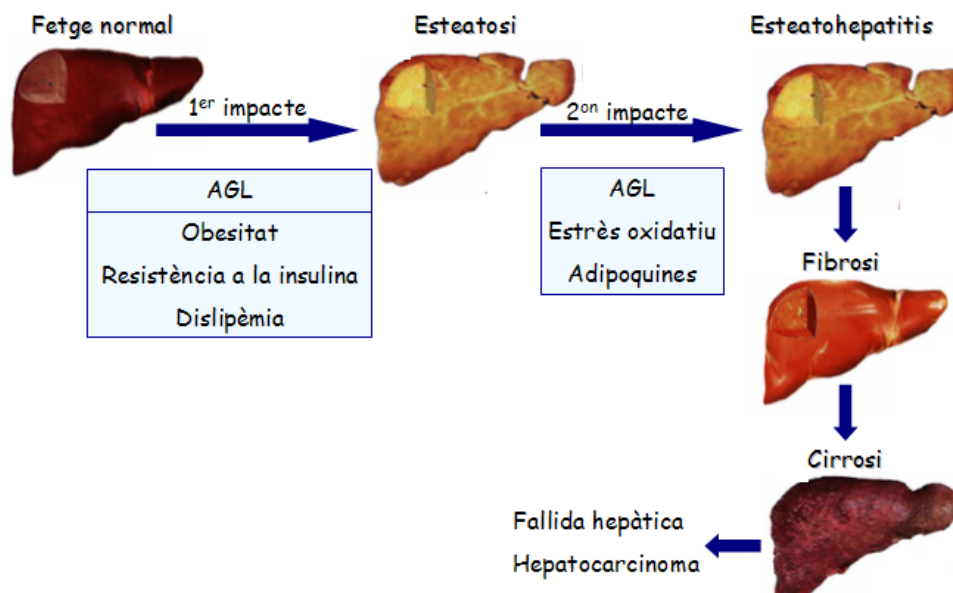


Figura 7: Estadis de la malaltia hepàtica grassa no alcohòlica. AGL, àcids grassos lliures.

L'any 1998 es va proposar el model de "doble impacte" per explicar les causes de la progressió de l'hepatopatia grassa no alcohòlica (Day i James, 1998). Segons aquest model, el primer impacte és la presència d'esteatosi degut a un excés d'àcids grassos procedents del teixit adipós i una resistència a la insulina perifèrica. El segon impacte és l'aparició d'esteatohepatitis, histològicament caracteritzada per la presència de focus inflamatoris, molt rics en neutròfils i macròfags, mort hepatocitària i fibrosi. Les causes d'aquest segon impacte són per una part l'augment de la disfunció mitocondrial i l'estrès oxidatiu al fetge produït per els àcids grassos lliures, i d'una altra banda les adipoquines proinflamatòries que arriben al fetge a través de la circulació induïdes per l'estat d'inflamació crònic al teixit adipós obès (Browning i Horton, 2004; Day, 2006). Després de l'esteatohepatitis no alcohòlica el pacient pot desenvolupar fibrosi, que a la vegada pot progressar a cirrosi; i els pacients que desenvolupen cirrosi s'enfronten a un alt risc de mort per carcinoma hepatocel·lular o fallida hepàtica (Angulo, 2002; Browning i Horton, 2004) (Figura 7).

El procés d'inflamació hepàtica en aquestes condicions s'origina amb la presència d'àcids grassos lliures. Els pacients amb esteatohepatitis no alcohòlica presenten anomalies mitocondrials, que donen lloc a la interrupció del flux d'electrons de la cadena respiratòria i contribueixen a incrementar la producció de ROS als hepatòcits durant l'oxidació dels àcids grassos. Aquesta disfunció mitocondrial produeix que els àcids grassos lliures s'acumulin al citosol i augmentin encara més la presència de ROS i produeixin estrès oxidatiu i peroxidació lipídica al fetge (Browning i Horton, 2004). A nivell cel·lular, les ROS i la peroxidació lipídica produeixen la mort hepatocitària, en forma d'apoptosi o necrosi; estimulen les cèl·lules de Kupffer incrementant la generació de citoquines proinflamatòries com el $TNF\alpha$; promouen el reclutament de més cèl·lules inflamatòries; i activen les cèl·lules hepàtiques estelades (Pessayre, 2002). Tot això condueix a la cronificació de la resposta inflamatòria i la fibrosi al fetge (Browning i Horton, 2004).

5) Efectes moduladors de les vies de la COX-2 i la 5-LO al fetge

Diverses evidències relacionen els mediadors lipídics derivats de l'àcid araquidònic amb la fisiopatologia de la malaltia hepàtica (Clària i Titos, 2004), sent les cèl·lules de Kupffer les principals responsables de la síntesi d'eicosanoids al sinusoides hepàtic (Decker, 1985). A més, la producció dels eicosanoids i l'expressió dels enzims de la COX-2 i la 5-LO s'indueix quan les cèl·lules de Kupffer s'activen sota certs estímuls inflamatoris com l'obesitat, l'alcohol, endotoxines, compostos procedents de la degradació de fàrmacs i xenobiòtics (Clària i Titos, 2004).

En aquest sentit, les cèl·lules de Kupffer activades expressen la COX-1 i la COX-2, sent el principal prostanoid alliberat la PGD_2 ; encara que com a resposta a determinats estímuls s'allibera majoritàriament PGE_2 (Clària i Titos, 2004; Decker, 1985). A més, també produeixen nivells detectables de PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$, PGI_2 i TXA_2 (Decker, 1985; Planagumà *et al.*, 2002; Winwood i Arthur, 1993). Les cèl·lules hepàtiques estelades, que expressen la COX-2 quan s'activen, i les endotelials també sintetitzen alguns d'aquests prostanoids (Athari *et al.*, 1994; Efsen *et al.*, 2001; Mallat *et al.*, 1998; Rieder *et al.*, 1990).

Respecte a la via de la 5-LO, clàssicament s'ha considerat a la cèl·lula de Kupffer com la responsable de la síntesi de LTs al fetge (Kepler *et al.*, 1988). De fet, al teixit hepàtic, aquestes cèl·lules són les úniques que posseeixen tots els enzims necessaris per la síntesi d'aquests eicosanoids: 5-LO, FLAP, LTA4H i LTC4S (Shimada *et al.*, 1998; Titos *et al.*, 2000, 2003). No obstant, com que els hepatòcits i les cèl·lules endotelials expressen la LTC4S, és possible que els cis-LTs s'originin a través d'un metabolisme transcel·lular; de manera que el LTA_4 produït per les cèl·lules de Kupffer es transformi als hepatòcits (Fukai *et al.*, 1996;

Shimada *et al.*, 1998; Titos *et al.*, 2000). En canvi, les cèl·lules hepàtiques estelades no poden sintetitzar leucotriens i només són cèl·lules diana a l'efecte d'aquests (Titos *et al.*, 2000, 2003).

Durant els últims anys, s'han aportat sòlides evidències de la participació de les vies de la COX-2 i la 5-LO a les malalties hepàtiques, i diversos estudis indiquen que la síntesi i alliberament d'eicosanoids derivats d'aquestes vies contribueixen a la inflamació i la fibrogènesi al fetge (Núñez *et al.*, 2004; Planagumà *et al.*, 2005; Titos *et al.*, 2000, 2003, 2005; Yamamoto *et al.*, 2003). De fet, l'expressió de la COX-2 està sobreregulada a pacients amb malalties hepàtiques cròniques com l'hepatitis B i C, o amb cirrosi (Cheng *et al.*, 2002, 2004; Mohammed *et al.*, 2004; Núñez *et al.*, 2004). De la mateixa manera, hi ha un augment de l'expressió de la COX-2 i dels nivells hepàtics de PGs a models animals de inflamació i fibrosi hepàtica induït amb CCl₄ (Planagumà *et al.*, 2005), hepatopatia alcohòlica (Nanji *et al.*, 1997a; 1997b) i esteatohepatitis no alcohòlica (Dela Peña *et al.*, 2007; Yamamoto *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2006). Addicionalment, s'ha mostrat que la sobreexpressió d'un transgen de la COX-2 humana al fetge de ratolins causa nivells elevats de transaminases i signes histològics d'hepatitis (Yu *et al.*, 2007).

Actualment, existeix una certa controvèrsia respecte a si l'efecte fibrogènic de la COX-2 està mitjançat per prostaglandines, ja que s'han observat efectes reguladors tant positius com negatius de la PGE₂ sobre l'activació de les cèl·lules hepàtiques estelades (Bataller *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2002; Efsen *et al.*, 2001; Hui *et al.*, 2004; Mallat *et al.*, 1998). De totes maneres, resultats més concloents s'han observat mitjançant l'ús d'inhibidors selectius de la COX-2, els quals exerceixen efectes antibrogènics a models animals d'esteatohepatitis o fibrosi hepàtica induïda per CCl₄ (Davies *et al.*, 2006; Planagumà *et al.*, 2005; Yamamoto *et al.*, 2003). A més, hi ha una correlació positiva entre l'expressió de la COX-2 i la progressió de la fibrosi hepàtica a pacients amb virus C (Núñez *et al.*, 2004); i la inhibició de la COX-2 redueix la proliferació i

potencia l'apoptosi a les cèl·lules hepàtiques estrellades (Cheng *et al.*, 2002b; Planagumà *et al.*, 2005).

Diverses evidències indiquen un efecte modulador de la 5-LO sobre la malaltia hepàtica, tenint efectes similars als que s'han descrit per a la via de la COX-2. S'ha observat que hi ha una augmentada excreció urinària de productes derivats de la 5-LO a pacients amb malalties hepàtiques cròniques (Clària *et al.*, 1998; Uemura *et al.*, 1994). De la mateixa manera, a models experimentals animals de fibrosi hepàtica induïda per CCl₄ o tioacetamida, la 5-LO i els nivells hepàtics de leucotriens es troben incrementats (Graupera *et al.*, 2002; Muller *et al.*, 1996; Titos *et al.*, 2000). Conseqüentment, el bloqueig de la via de la 5-LO mitjançant l'inhibidor de la FLAP Bay-X-1005 redueix la necroinflamació i la fibrogènesi hepàtica a models experimentals (Titos *et al.*, 2003, 2005). Estudis *in vitro*, indiquen que els productes de la 5-LO, principalment el LTD₄, són capaços d'activar i estimular la proliferació de les cèl·lules hepàtiques estrellades i la síntesi de col·lagen (Baud *et al.*, 1985, 1987; Phan *et al.*, 1988; Titos *et al.*, 2000). Interessantment, la inhibició d'aquesta via indueix l'apoptosi a les cèl·lules de Kupffer en paral·lel amb els efectes antifibrogènics, suggerint que els mecanismes protectors de la inhibició de la 5-LO estan relacionats amb la inducció de l'apoptosi a les cèl·lules inflamatòries del fetge (Titos *et al.*, 2003, 2005).

Per una altra banda, dos estudis recents del nostre grup d'investigació indiquen que la via de 5-LO té un paper a l'esteatosi lligada a l'obesitat: la deleció de la 5-LO en un model d'hiperlipidèmia disminueix la inflamació hepàtica i l'acumulació de TG als hepatòcits (Martínez-Clemente *et al.*, 2009); i la via de la 5-LO modula el transport lipídic al fetge de ratolins obesos *ob/ob*, a través de mecanismes involucrats a la regulació de la proteïna microsomal de transferència de TG (MTP) i la secreció de VLDL-TG i ApoB (López-Parra *et al.*, 2008). A més,

un estudi lipidòmic a pacients ha caracteritzat els HETEs (5, 8 i 15) com a determinants en la progressió de la malaltia a esteatohepatitis (Puri *et al.*, 2009).

Finalment, un estudi recent indica que la COX-2 podria estar també implicada a la hepatopatia grassa no alcohòlica, on l'administració de celecoxib disminueix l'acumulació de TG intrahepàtics (Hsieh *et al.*, 2009). De fet, anteriorment ja s'havia descrit que l'alliberament de PGE₂ per la cèl·lula de Kupffer indueix la síntesi de TG a hepatòcits i contribueix a l'aparició d'esteatosi en un model experimental d'esteatohepatitis alcohòlica (Enomoto *et al.*, 2000).

III-INFLAMACIÓ AL TEIXIT ADIPÓS I PATOLOGIES ASSOCIADES

L'estat de inflamació crònic al teixit adipós associat a l'obesitat s'ha identificat com un factor clau en el desenvolupament del síndrome metabòlic, i actualment es considera que la inflamació del teixit adipós és la relació entre l'obesitat, la resistència a la insulina, les malalties cardiovasculars i l'hepatopatia grassa no acohòlica. De fet, s'ha demostrat que l'acumulació de teixit adipós contribueix al desenvolupament de la diabetis *mellitus* tipus 2, la hipertensió, la hipercolesterolèmia, l'aterosclerosi, l'esteatosi, i és un factor de risc per a alguns càncers, l'artritis i la malaltia d'Alzheimer (Ferrante, 2007).

1) El teixit adipós

Als mamífers, el teixit adipós es troba de dues formes diferents: el teixit adipós marró i el blanc, sent aquest últim el majoritari a l'organisme. Dintre del teixit adipós, els adipòcits són el principal tipus cel·lular. Els del teixit adipós blanc emmagatzemen l'energia procedent de la dieta en forma de TG dins d'una gran gota lipídica. En moments de necessitats energètiques, aquests TG poden ser ràpidament hidrolitzats per lipases (el que es coneix com a lipòlisi) i els àcids grassos resultants es transporten a altres teixits on són oxidats a les mitocondries per obtenir energia. Per una altra banda, el teixit adipós marró es troba principalment als neonats i la seva funció més important és la regulació de la temperatura corporal a través de la termogènesi. Per això els adipòcits d'aquest teixit estan caracteritzats per moltes i petites gotes lipídiques, que es poden transformar ràpidament en calor a les múltiples mitocòndries.

Fins fa poc es considerava que el teixit adipós era un teixit passiu amb la seva principal funció de captació de glucosa i emmagatzematge d'energia. Però actualment, es creu que té un paper altament dinàmic sent una font de senyals rellevants per l'homeòstasi energètica, la fertilitat i la renovació òssia. Per exemple, actua sobre el sistema nerviós central controlant la

ingesta i la sensació de sacietat, sobre la funció hepàtica controlant el metabolisme de lípids i l'emmagatzematge energètic, i sobre el sistema muscular, controlant el metabolisme energètic (Figura 8). La forma en què el teixit adipós es comunica és mitjançant la síntesi i secreció d'uns mediadors solubles anomenats adipoquines (citoquines i altres proteïnes del teixit adipós), que són senyals autocrines i paracrines dintre del mateix teixit i endocrines afectant a altres òrgans.

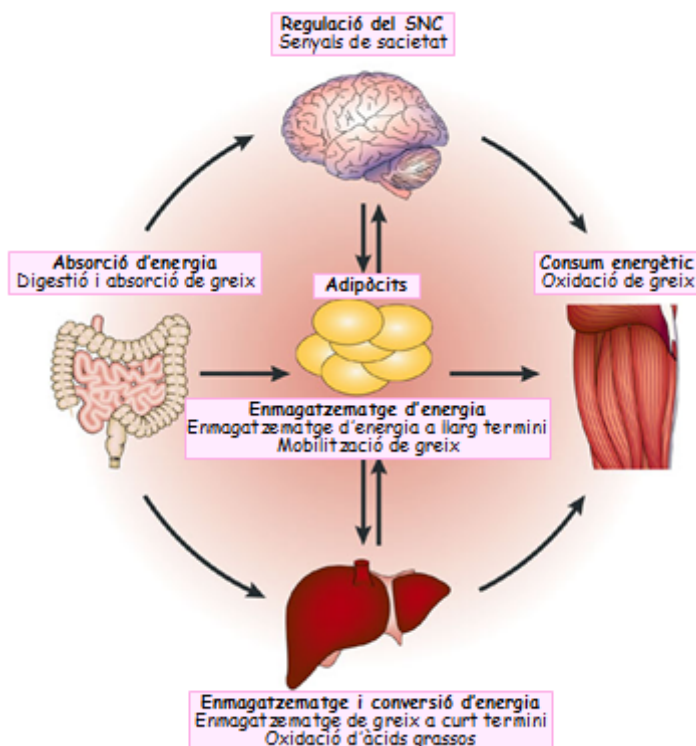


Figura 8: Influència del teixit adipós en altres òrgans. SNC, Sistema nerviós central. (Figura adaptada de Shi i Buru, 2004).

Les adipoquines són secretades per els adipòcits i per les altres cèl·lules que es troben al teixit adipós, les anomenades cèl·lules de la fracció estromal (SVC) que comprenen preadipòcits, cèl·lules endotelials, fibroblastes, leucòcits i macròfags. Les cèl·lules endotelials formen vasos sanguinis que transporten les adipoquines secretades cap als altres teixits i així poder exercir la funció de regulació metabòlica. A la taula 6 es detallen les adipoquines més importants conegudes actualment.

Taula 6: Adipoquines

<i>Adipoquines específiques del teixit adipós</i>		
Leptina	Resistina	Vaspina
Adiponectina	Visfatina	Adipsina
<i>Adipoquines no específiques del teixit adipós</i>		
TNF α	TGF- β	CSF-1
MCP-1	IGF- β	RBP-4
IL-6	PAI-1	Haptoglobina
IL-1 β	VCAM-1	Angiotensinògen
IL-8	ICAM-1	Factors del complement
IL-10	SAA	

Algunes d'aquestes molècules són claus per al manteniment de l'homeòstasi de l'organisme; per exemple, la leptina és una senyal cap al cervell que informa sobre la sacietat i l'estat nutricional de l'organisme, i l'adiponectina controla el metabolisme dels lípids i la sensibilitat a la insulina.

2) Canvis al teixit adipós durant l'obesitat

Durant els últims 15 anys, s'han estat investigant els canvis del teixit adipós blanc i de les adipoquines associats amb l'estat crònic inflamatori produït per l'obesitat, i s'ha identificat el paper crític de les cèl·lules immunes i les molècules proinflamatòries induïdes. S'ha observat que en aquestes condicions, hi ha una sobreexpressió d'interleuquines (IL-1, IL-1Ra, IL-8, IL-18 i IL-10), factors del creixement com el TGF- β , proteïnes secretades durant la fase aguda de la inflamació (IL-6, PAI-1, haptoglobina, SAA, proteïna reactiva C), quimioquines (MCP-1,3,4), molècules d'adhesió (ICAM-1, VCAM-1), angiopoietines, metalotioneïnes, resistina, MIP-1 γ , iNOS, factors del complement i proteïnes d'unió al retinol RBP-4 (Canello *et al.*, 2006; Girard i Lafontan, 2008; Hotamisligil *et al.*, 1993; Lafontan i Girard, 2008; Perreault i Marette, 2001;

Samad *et al.*, 1996, 1997; Sartipy i Loskutoff, 2003; Vgontzas *et al.*, 1997; Visser *et al.*, 1999). D'entre tots aquests marcadors modulats durant aquest procés, podem destacar la disminució de l'adiponectina i l'augment del $\text{TNF}\alpha$, IL-6, IL-1 β , MCP-1, resistina i els àcids grassos lliures circulants, com els factors més importants per al desenvolupament de les malalties associades a l'obesitat (Figura 9). De fet, s'han descrit aquestes alteracions a ratolins i pacients obesos i amb diabetis tipus 2 (Hotamisligil, 2006; Wellen i Hotamisligil, 2003).

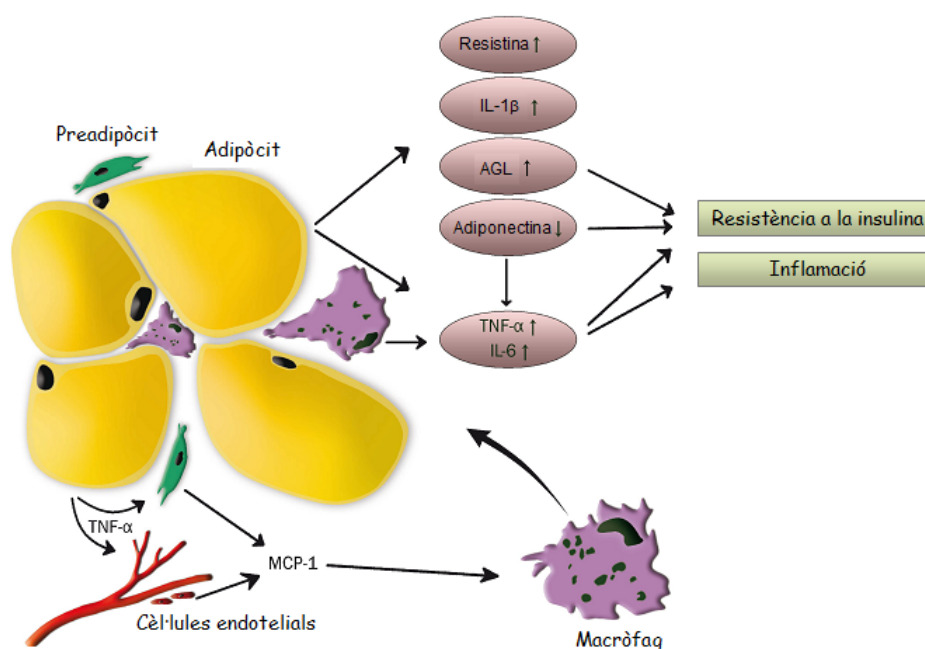


Figura 9: Alteracions del teixit adipós durant l'obesitat. AGL, àcids grassos lliures; IL, interleuquina; MCP: proteïna quimioattractant de monòcits; TNF, factor de necrosi tumoral. (Figura adaptada de van Kruijsdijk *et al.*, 2009).

D'acord amb aquesta influència de les molècules proinflamatòries, les cèl·lules immunes i en particular els macròfags són participants actius a la inflamació induïda per l'obesitat i les seves complicacions. De fet, dos estudis independents van demostrar per primer cop l'any 2003 que la manera com l'obesitat induïa un estat d'inflamació de baix grau era amb la infiltració de macròfags al teixit adipós blanc (Weisberg *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2003). D'aquesta manera, el teixit adipós de persones sanes normalment conté entre un 5-10% de macròfags, mentre que als pacients obesos el contingut arriba fins al 50% de les cèl·lules (Weisberg *et al.*, 2003). A

més, tant a ratolins com humans, el percentatge de macròfags al teixit adipós es correlaciona amb l'adipositat (índex de massa corporal, percentatge de greix corporal i mida dels adipòcits).

La distribució del teixit adipós també és important per a les complicacions metabòliques de l'obesitat; tenint cada tipus de teixit adipós un perfil metabòlic, endocrí i inflamatori diferent. Per exemple, la infiltració elevada de macròfags al teixit adipós visceral però no al subcutani, contribueix a la inflamació sistèmica observada durant l'obesitat (Fontana *et al.*, 2007; Harman-Boehn *et al.*, 2007); i el teixit subcutani de ratolins i humans té menys infiltrat macrocitari i expressa més leptina i menys TNF α que el teixit adipós visceral (Canello *et al.*, 2005; Weisberg *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2003). Aquestes diferències també s'observen a nivells dels adipòcits, tenint un fenotip més benigne els del teixit adipós subcutani.

3) Origen de la inflamació al teixit adipós

Diverses teories diferents expliquen l'origen de la inflamació al teixit adipós. Estan basades en conceptes com la hipòxia, la necrosi adipocitària, el reclutament de macròfags, la resistència a la insulina i la sobrecàrrega lipídica. Actualment, es creu que tots aquests factors expliquen una part del procés d'inflamació i que el més probable és que tots ells contribueixin a la inflamació del teixit adipós observada durant l'obesitat.

Diverses investigacions indiquen que el primer estímul per a l'aparició de la resposta inflamatòria crònica del teixit adipós podria ser la hipòxia. Durant l'obesitat, la sobrealimentació i la disminució d'exercici físic dona lloc a un augment de nutrients energètics fent que els adipòcits s'engrandeixin (hipertròfia i hiperplàsia). Es creu que mentre el teixit adipós s'expandeix, els adipòcits s'allunyen dels vasos sanguinis i s'oxigenen poc (Neels i Olefsky, 2006).

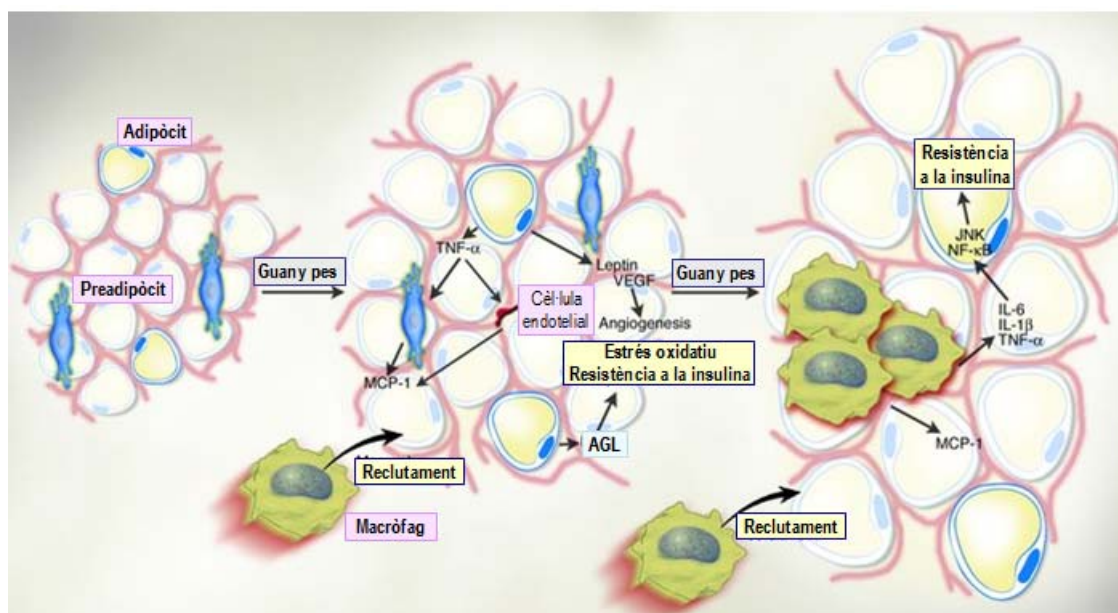


Figura 10: Inflamació del teixit adipós durant l'obesitat. AGL, àcids grassos lliures; IL, interleuquina; JNK, quinasa c-Jun N-terminal; MCP, proteïna quimioattractant de monòcits; NF- κ B, factor nuclear κ B; TNF, factor de necrosi tumoral; VEGF, factor de creixement vascular endotelial (Figura adaptada de Wellen i Hotamisligil, 2003).

Aquest estat de hipòxia relativa, que s'ha detectat directament per immunohistoquímica al teixit adipós de ratolins obesos, activa el HIF-1 α , un regulador de l'homeòstasi de l'oxigen, i aleshores s'estimula un programa específic d'expressió gènica que pot donar al reclutament de macròfags al teixit adipós (Cancello *et al.*, 2006; Koza *et al.*, 2006). Donant suport a aquesta teoria, s'ha observat que l'expressió de gens associats amb la hipòxia (Hif-1 α , Glut1 i Pdk1) es correlaciona amb una reducció de l'adiponectina i un augment de les proteïnes relacionades amb la inflamació TNF α , IL-1 β , IL-6 i TGF- β (Chen *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007; Ye *et al.*, 2007). En altres teixits, la hipòxia s'associa amb un increment a la fibrosi, a través de la sobrerregulació de proteïnes de la matriu extracel·lular (Higgins *et al.*, 2008). És probable doncs que la hipòxia donada durant la expansió del teixit adipós estigui associada a un incrementat grau de deposició de matriu extracel·lular, encara que no està clar si això contribueix directament a l'augment de necrosi adipocitària observada en aquestes condicions (Cinti *et al.*, 2005). A més, el desenvolupament de la hipòxia al teixit adipós durant l'obesitat està relacionat

directament amb una incrementada producció de ROS, comportant l'aparició d'estrès oxidatiu i l'activació de JNK i altres quinases (Figura 10) (Houstis *et al.*, 2006).

Mentre aquest procés succeeix, les cèl·lules adiposes emeten senyals als vasos del teixit adipós, estant dins la vasculatura també involucrada a la inflamació. El teixit adipós creixent augmenta la microcirculació mitjançant angiogènesi per poder suplir-se de nous lípids i oxigen. Donant suport a aquest idea, la inhibició de l'angiogènesi al teixit adipós evita el desenvolupament de l'obesitat i les complicacions associades a aquesta (Rupnick *et al.*, 2002).

Les cèl·lules endotelials de la vasculatura del teixit adipós produeixen diferents molècules d'adhesió cel·lular, que no són només importants per a l'angiogènesi sinó també per al funcionament dels adipòcits i les SVC (Hausman i Richardson, 2004). Durant l'obesitat les molècules d'adhesió com les integrines ICAM-1 i VCAM-1 es troben augmentades, sent un efecte necessari per a l'adhesió dels monòcits a l'endoteli activat (Brake *et al.*, 2006; Weisberg *et al.*, 2003); de la mateixa manera es comencen a produir factors quimiotàctics tal com el MCP-1 (Xu *et al.*, 2003). De fet, l'adipositat es correlaciona amb l'expressió de MCP-1 que es secretat per els adipòcits hipertròfics. Aquest és un factor crític en el reclutament de monòcits al lloc de dany i inflamació, ja que els monòcits circulants i els macròfags del teixit adipós expressen el receptor primari del MCP1, el CCR2 (Figura 11) (Sartipy i Loskutoff, 2003; Takahashi *et al.*, 2003). Aquests macròfags infiltrats durant l'obesitat deriven dels monòcits circulants, i la seva diferenciació depèn del CSF-1, el factor de creixement específic dels macròfags que produeixen els adipòcits (Weisberg *et al.*, 2003). El MCP-1 és un factor tant crític al reclutament de macròfags que la deficiència d'ell mateix o el seu receptor disminueix el contingut de macròfags al teixit adipós i la resistència a la insulina a ratolins obesos (Kamei *et al.*, 2006; Weisberg *et al.*, 2006).

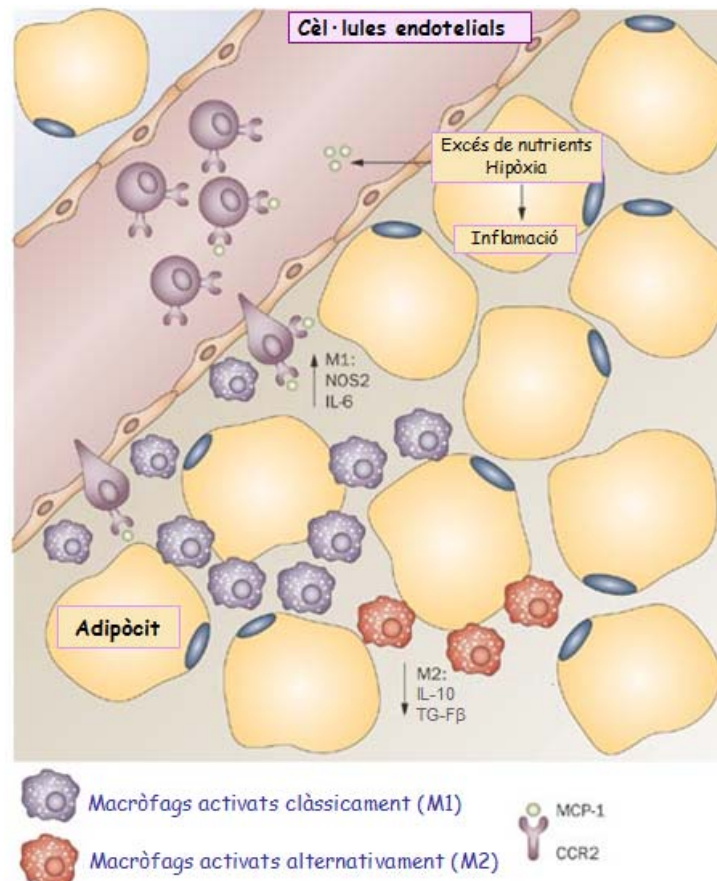


Figura 11: Macròfags al teixit adipós inflammat. CCR, receptor de quimioquines C-C; IL, interleuquina; MCP, proteïna quimioattractant de monòcits; NOS, sintasa de l'òxid nítric; TGF- β , factor de creixement transformant β . (Figura adaptada de Rocha i Libby, 2009).

Estudis recents indiquen que l'obesitat produeix un canvi de fenotip al *pool* de macròfags tissulars des del tipus alternativament activats M2 als clàssicament activats de tipus M1, els quals inicien la reacció inflamatòria (Lumeng *et al.*, 2008; Odegaard *et al.*, 2007). Els macròfags que es recluten des de la circulació en resposta a l'estímul inflamatori són del tipus M1 i aquests s'acumulen al teixit adipós blanc juntament als macròfags M2 residents (Lumeng *et al.*, 2007, 2008). Aquest fenomen resulta a canvis al perfil de les citocines i altres molècules secretades per el teixit sent la IL-10 i el TGF- β característics dels M2 i les molècules proinflamatòries TNF α , IL-6, IL-1 β , MCP-1, iNOS o COX-2 característiques dels M1 (Gordon *et al.*, 2003; Odegaard *et al.*, 2007). Els macròfags M2, la funció dels quals és la resolució de la inflamació, protegeixen del desenvolupament de la inflamació i de la resistència a la insulina, probablement per la

regulació de l'activitat del PPAR γ (Gordon, 2007; Odegaard *et al.*, 2007). L'activació clàssica dels macròfags durant la inflamació del teixit adipós està relacionada amb la presència d'adipòcits necròtics resultants de la hipertròfia i hipòxia induïda (Cinti *et al.*, 2005).

Interessantment, els macròfags del teixit adipós durant la obesitat formen estructures en corona al voltant del adipòcits necròtics, indicant la possibilitat que els adipòcits poden aconseguir una mida màxim abans de la mort cel·lular, quan aleshores atrauen macròfags per fagocitar les restes necròtiques (Cinti *et al.*, 2005).

No obstant, les poblacions de macròfags al teixit adipós no estan del tot ben definides i es creu que hi ha una mescla de fenotips (Zeyda *et al.*, 2007). D'aquesta manera, els macròfags que es troben en pacient primis i amb sobrepès presenten marcadors de la polarització tipus M1 i M2 (Bourlier *et al.*, 2008). A l'estat d'obesitat mòrbida, sembla que el fenotip està influenciat per els canvis a l'adipositat, ja que només s'arriba a detectar el marcador de M2 IL-10, després de la cirurgia bariàtrica (Cancello *et al.*, 2005). En aquest estudi també es va observar que l'acumulació de macròfags al teixit adipós és un procés dinàmic on la disminució de macròfags al teixit adipós està associada amb una disminució de pes.

Tant a humans com a models murins, aquests macròfags infiltrats al teixit adipós secreten més adipoquines proinflamàtores de manera que existeixen cicles de retroalimentació recíproca entre l'activació d'adipòcits i macròfags resultant en un major reclutament de macròfags (de Luca i Olefsky, 2008; Matsuzawa, 2006).

Recentment, s'ha suggerit que altres cèl·lules inflamàtores (cèl·lules NK, limfòcits T i neutròfils) també s'infiltraen al teixit adipós durant la obesitat tant a pacients com a ratolins sotmesos a una dieta rica en greix (Caspar-Baugil *et al.*, 2005; Kintscher *et al.*, 2008; Nieman *et al.*, 1996; Womack *et al.*, 2007). La proporció d'aquestes cèl·lules és menor que la dels

macròfags, però els limfòcits T poden contribuir a l'activació cel·lular i jugar un paper important a la iniciació i manteniment de la inflamació al teixit adipós i al desenvolupament de la resistència a la insulina (Kintscher *et al.*, 2008; Nishimura *et al.*, 2009).

4) Paper dels àcids grassos lliures

En aquest context d'obesitat, l'elevació de la concentració dels àcids grassos lliures circulants és un important factor patofisiològic en part responsable de la resistència a la insulina i les condicions associades a l'obesitat a pacients obesos (Arner, 2007). Sota un context de falta de sensibilitat a la insulina, els adipòcits disminueixen la capacitat d'emmagatzemar lípids i alliberen àcids grassos lliures d'una manera no controlada; al fetge no es produeixen els efectes supressors de la insulina a la producció de glucosa endògena; i al múscul esquelètic es perden els efectes estimulants de la insulina a l'entrada de glucosa perifèrica i la síntesi de glicogen. Específicament, els nivells elevats d'àcids grassos lliures redueixen l'entrada de glucosa per el GLUT-4 i inhibeixen el receptor d'insulina per fosforilació del IRS-1 (Hotamisligil *et al.*, 1996). Aleshores, l'efecte de la resistència a la insulina a nivell dels adipòcits resulta en una augment de la lipòlisi, resultant dons en un cicle en el que es van incrementant els àcids grassos lliures (Shulman, 2000). Aquest efecte s'ha observat a pacients obesos amb resistència a la insulina i a diabètics tipus 2 (Groop *et al.*, 1998; Jensen *et al.*, 1989). Els àcids grassos lliures estan directament involucrats a l'activació de la resposta immune durant l'obesitat i al desenvolupament de l'estat inflamatori mitjançant l'activació de diverses vies de senyalització: s'uneixen a receptors de la resposta innata sobreexpressats al teixit adipós, com el TLR4 i activen els sistemes IKK β -NF- κ B, JNK-AP1, augmentant la producció de les citokines associades a aquests (Shoelson *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2006). De fet la inhibició del NF- κ B (Arkan *et al.*, 2005) i la JNK (Solinas, *et al.*, 2007) als macròfags reverteixen la resistència a la insulina induïda per dieta. El TNF α i la IL-6, secretats en grans quantitats per els macròfags

infiltrats, també potencien l'estat inflamatori crònic i indueixen la resistència a la insulina; aquestes adipoquines sembla que estimulen la lipòlisi amb els mateixos mecanismes que els àcids grassos lliures (Wellen *et al.*, 2005).

Un altre factor important a tenir en compte és que els àcids grassos lliures i les citoquines proinflamatòries incrementen la generació de ROS a les cèl·lules endotelials i adipòcits, que poden contribuir al desenvolupament de la resistència a la insulina induïda a la obesitat activant també les vies del NF- κ B i de la JNK. (Keaney *et al.*, 2003).

L'excés de TG i àcids grassos lliures circulant resulten a l'acumulació de greix ectòpic a altres òrgans com el fetge, el múscul o el pàncreas, induint en aquests teixits una resposta inflamatòria i resistència a la insulina. Això suggereix que el teixit adipós protegeix els altres òrgans dels efectes lipotòxics. De fet, la falta de teixit adipós produeix concentracions elevades de TG i àcids grassos, i genera resistència a la insulina a ratolins i humans (He *et al.*, 2003; Moitra *et al.*, 1998).

5) Influència del teixit adipós sobre les malalties hepàtiques

És important tenir en compte que l'eix adipohepàtic afecta a l'ús i el flux de lípids i carbohidrats, existint una comunicació constant entre els dos òrgans mitjançant adipoquines, factors lipídics i lipoproteïnes. Una disfunció en qualsevol d'aquests teixits és perjudicial per a l'altre i per a tot l'organisme. De fet, un dels primers òrgans afectat quan el teixit adipós s'inflama i esdevé disfuncional és el fetge.

En condicions de dejú, els àcids grassos s'alliberen per la lipòlisi dels TG al teixit adipós a través de la lipasa sensible a hormones (HSL) i el fetge els capta d'una manera proporcional a la seva concentració plasmàtica (Figura 12). Amb una dieta lipogènica, els àcids grassos és

sintetitzen *de novo* al fetge i al teixit adipós. Als animals sans, els hepatòcits són capaços de mantenir una velocitat de secreció de VLDL suficient per prevenir l'acumulació en excés de TG al citoplasma, es a dir l'esteatosi. De fet, una de les conseqüències metabòliques més importants de la inflamació derivada de la obesitat, l'alliberament d'adipoquines i l'augment del flux d'àcids grassos lliures al fetge és l'esteatosi (Angulo, 2002; Sanyal, 2005). Sota condicions d'hiperinsulinèmia, la inducció de SREBP-1c, PPAR γ i gens lipogènics i la inhibició de la secreció de les VLDL provoquen que els TG s'acumulin als hepatòcits (Browning i Horton, 2004).

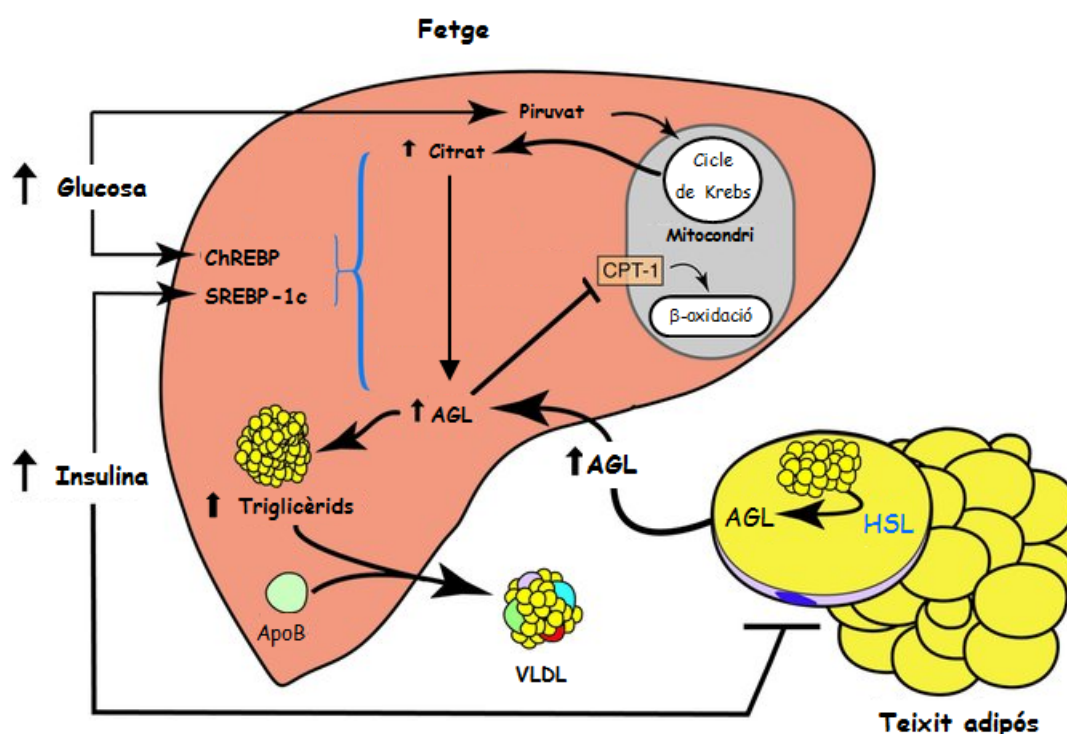


Figura 12: Mecanismes d'acumulació de lípids al fetge. AGL: àcids grassos lliures, ApoB: apolipoproteïna B, CPT-1: carnitil palmitoil transferasa-1, ChREBP: Proteïna d'unió a l'element de resposta a carbohidrats, SREBP-1c: proteïna d'unió a l'element de resposta a esterols, VLDL: lipoproteïna de molt baixa densitat. (Figura adaptada de Browning i Horton, 2004).

Tal com hem dit, l'obesitat té un paper clau a l'hepatopatia grassa no alcohòlica, però a més, també empitjora la progressió de la hepatitis crònica per virus C i la malaltia hepàtica alcohòlica, i està associada a un increment a la mortalitat de diferents càncers del tracte gastrointestinal, com el carcinoma hepatocel·lular. (Adinolfi *et al.*, 2001; Calle *et al.*, 2003). A

més, la rellevància del teixit adipós a les malalties hepàtiques està demostrada per la major prevalència de la cirrosi a pacients obesos (Marchesini *et al.*, 2008).

En aquest context de malaltia hepàtica, el teixit adipós visceral és únic ja que les citokines i altres factors produïts a aquest nivell afecten directament al fetge a través de la vena porta. Aquest és el cas de les citokines proinflamàtores $TNF\alpha$ i IL-6; la leptina, que s'ha associat a la fibrogènesi de les cèl·lules estelades; la resistina, que antagonitza l'efecte hepàtic de la insulina i augmenta els nivells de glucosa; i sobretot l'adiponectina, que exerceix un efecte hepatoprotector millorant la sensibilitat a la insulina i tenint efectes antifibrogènics (Day, 2006; Jensen, 2008). De fet, el greix visceral i els nivells sèrics de IL-6 estan directament associats amb la inflamació i fibrosi hepàtica a pacients amb malaltia del fetge gras no alcohòlic (van der Poorten *et al.*, 2008).

6) Efectes moduladors de les vies de la COX-2 i la 5-LO sobre el teixit adipós

Les dues vies majoritàries de generació d'eicosanoids i els seus productes sembla que també estan implicades a la inflamació del teixit adipós i les patologies relacionades amb la seva disfunció (resistència a la insulina, malalties cardiovasculars i esteatosi hepàtica).

Dintre de la via de la 5-LO, la proteïna FLAP ha estat recentment identificada com una diana emergent a les malalties metabòliques. De fet, la FLAP està sobreexpressada al teixit adipós de pacients i animals amb obesitat i resistència a la insulina (Bäck *et al.*, 2007; Kaaman *et al.*, 2006); i hi ha una correlació entre diferents haplotips de la FLAP, l'obesitat i la resistència a la insulina en pacients (Kaaman *et al.*, 2006). A més, els productes de la 5-LO tenen efectes pleiotròpics a l'acumulació de greix adipós i la funció pancreàtica a ratolins (Mehrabian *et al.*, 2005 i 2008); i l'administració d'un inhibidor inespecífic de les LO disminueix l'hipertriglicèmia,

l'hiperglicèmia i els àcids grassos lliures, i millora la resistència a la insulina a rates (Gowri *et al.*, 2000; Reed *et al.*, 1999). Diverses investigacions també atorguen un paper d'aquesta via a les malalties cardiovasculars: la 5-LO col·localitza amb cèl·lules inflamatòries a la placa d'ateroma (Qiu *et al.*, 2006; Spanbroek *et al.*, 2003), és un factor de risc per a l'aterosclerosi a pacients (Dwyer *et al.*, 2004; Mehrabian *et al.*, 2002) i participa a les complicacions cardiovasculars de la hiperlipidèmia (Zhao *et al.*, 2004). Respecte a l'esteatosi associada amb l'obesitat, tal com hem comentat anteriorment la 5-LO modula l'acumulació de lípids intrahepàtics i el 5-HETE està implicat a la progressió cap a esteatohepatitis no alcohòlica (López-Parra *et al.*, 2008; Martínez-Clemente *et al.*, 2009; Puri *et al.*, 2009).

Per una altra banda, recentment s'ha demostrat que la COX-2 està implicada a la inflamació del teixit adipós: la inhibició selectiva de la COX-2 amb celecoxib disminueix l'infiltrat de macròfags i l'expressió de TNF α al teixit adipós, i la resistència a la insulina a rates induïdes a l'obesitat (Hsieh *et al.*, 2009); i la inhibició de la COX amb aspirina redueix la secreció de IL-6 del teixit adipós de pacients i animals obesos (Ogston *et al.*, 2008). Amb anterioritat, ja s'havia identificat la COX-2 i la PGE₂ com a factors modulants de la diabetis i a la malaltia cardiovascular diabètica, però en condicions independents a la obesitat: la PGE₂ regula la funció dels illots pancreàtics i la secreció de la insulina induïda per la glucosa, i la COX-2 es troba sobreexpressa a pacients diabètics i a les cèl·lules endotelials en condicions d'hiperglicèmia (Cipollone *et al.*, 2003; Cosentino *et al.*, 2003; Robertson *et al.*, 1974; Shanmugam *et al.*, 2003).

OBJECTIUS

Els eicosanoids són els mediadors lipídics inflamatoris més potents i juguen un paper clau en diversos processos fisiològics i patològics modulant la iniciació, progressió i resolució de la inflamació. Per aquest motiu en la present tesi s'ha investigat el paper de les dues vies majoritàries de formació d'eicosanoids, la via de la COX-2 i la de la 5-LO, a dos teixits claus a l'homeòstasi corporal: el teixit hepàtic i el teixit adipós.

En referència al teixit hepàtic, recentment s'ha demostrat que la COX-2 i la 5-LO tenen funcions convergents contribuint a la inflamació hepàtica i conseqüentment a la transformació del teixit i la fibrosi. De fet, la COX-2 i la 5-LO estan sobreexpressades i es relacionen amb la malaltia hepàtica a pacients i a models experimentals animals de malaltia hepàtica. Estan involucrades a l'apoptosi de cèl·lules hepàtiques i la fibrogènesi *in vivo*. Però encara que ambdues vies semblen estar implicades al dany hepàtic, de moment no es coneix la contribució exacta de cada via a la iniciació i progressió de la inflamació i fibrosi hepàtica. Per tant, el primer objectiu d'aquesta tesi va ser investigar els efectes de la inhibició simultània de les vies de la 5-LO i la COX-2 en la inflamació i dany hepàtic i avaluar si aquesta inhibició proporciona una eficàcia antiinflamatòria superior al nostre model experimental. Específicament aquest objectiu es va assolir mitjançant els següents estudis:

1. Investigar els efectes sobre la inflamació i la fibrosi hepàtica de l'administració d'un inhibidor selectiu de la COX-2, SC-236, i d'un inhidor de la 5-LO de tipus no redox, CJ-13,610, sols o en combinació, a ratolins induïts a dany hepàtic mitjançant CCl₄.
2. Estudiar els efectes de la inhibició farmacològica de la COX-2 a ratolins genèticament deficients per la 5-LO sotmesos a dany hepàtic.
3. Avaluar la capacitat inhibidora d'aquests compostos a macròfags, el principal tipus inflamatori al fetge.

4. Investigar els efectes d'inhibidors i antagonistes d'aquesta via sobre la inflamació a macròfags murins.

Respecte al teixit adipós, en els darrers anys s'ha descrit recentment que l'obesitat i el síndrome metabòlic s'associen amb un estat crònic de inflamació en aquest teixit. Recentment, la via de la 5-LO, s'ha identificat recentment com una diana emergent a la malaltia metabòlica i l'esteatosi hepàtica tant a pacients com a models animals experimentals d'obesitat. En concret la proteïna FLAP està sobreexpressada al teixit adipós de pacients i animals amb obesitat i resistència a la insulina. No obstant, la possible involucració de la via de la 5-LO a la regulació de la inflamació i el metabolisme lipídic del teixit adipós a l'obesitat experimental encara no ha sigut del tot explorada. Per tant, el segon objectiu d'aquesta tesi va ser investigar els efectes de la via de la 5-LO sobre la inflamació del teixit adipós i la disfunció lipídica a l'obesitat, i si la seva inhibició pot representar una potencial estratègia terapèutica. Específicament aquest objectiu es va aconseguir mitjançant els següents estudis:

1. Caracteritzar la via de la 5-LO al teixit adipós i la seva modulació amb l'obesitat.
2. Avaluar els efectes dels LT sobre la inflamació al teixit adipós amb experiments *ex vivo* amb explants.
3. Estudiar si la via de la 5-LO modula el metabolisme dels àcids grassos lliures.
4. Investigar l'efecte de la via de la 5-LO a ratolins induïts a la obesitat amb una dieta rica en greix mitjançant l'administració d'un inhibidor de la FLAP.

RESULTATS

I.- ARTICLE 1

Estudi comparatiu de la protecció en front de la inflamació i fibrosi hepàtica per un inhibidor selectiu de la COX-2 i un inhibidor de la 5-LO de tipus no redox.

La inhibició selectiva de la COX-2 i la 5-LO disminueix la fibrosi a ratolins tractats amb CCl₄.

Els ratolins tractats amb injeccions de CCl₄ presentaven una marcada fibrosi amb extenses deposicions de col·lagen amb ponts fibròtics entre els espais porta. Per veure l'efecte dels inhibidors es va avaluar la fibrosi mitjançant la tinció de les mostres amb Sirius Red. L'administració de l'inhibidor selectiu de la COX-2, SC-236, va reduir significativament el percentatge d'àrea fibròtica. L'inhibidor de la 5-LO, CJ-13,610, va reduir de manera similar la fibrosi, sol o en combinació amb el SC-236.

La inhibició selectiva de la COX-2 i la 5-LO indueix l'apoptosi a cèl·lules hepàtiques no parenquimals.

Degut a que, les accions antifibrogèniques estan associades amb una inducció de l'apoptosi en cèl·lules no parenquimals, es va avaluar l'apoptosi mitjançant la tècnica TUNEL. El tractament amb els inhibidors (sols o combinats entre ells) va augmentar significativament el nombre de cèl·lules hepàtiques no parenquimals positives per TUNEL.

La inhibició simultània de la COX-2 i la 5-LO redueix la necroinflamació als ratolins tractats amb CCl₄.

Els ratolins tractats amb CCl₄ durant vuit setmanes tenien un dany hepàtic sever, tal i com va revelar l'examen histològic de les seccions hepàtiques tenyides amb hematoxilina-eosina. Els fetges presentaven necrosi hepatocitària marcada i extensa, inflamació, degeneració hidròpica a

les zones centrilobulars i necrosi en pont, alterant l'arquitectura lobular i sinusoidal del fetge. En aquests animals, els inhibidors administrats separatament no van modificar significativament la necroinflamació. En canvi, l'administració simultània de SC-236 i CJ-13,610 va reduir significativament el dany necroinflamatori.

L'administració de SC-236 a ratolins deficients per la 5-LO redueix el dany necroinflamatori i l'expressió de MCP-1.

Amb ratolins genèticament deficients per la 5-LO i tractats amb CCl_4 , es va confirmar que la inhibició de una única d'aquestes vies no és suficient per prevenir la necroinflamació hepàtica.

De fet, el dany hepatocel·lular va disminuir significativament als ratolins *knockout* per la 5-LO que van rebre SC-236, però no en els que van rebre placebo ni en els ratolins salvatges que van rebre SC-236. De la mateixa manera, l'expressió hepàtica de MCP-1, una proteïna quimioatracent que contribueix al manteniment de l'infiltrat inflamatori durant el dany hepàtic, només va disminuir significativament als ratolins deficients per la 5-LO que van rebre SC-236.

Respecte a la fibrosi, el SC-236 va ser capaç de reduir-la tant als ratolins salvatges com als deficients per la 5-LO. No obstant, els ratolins *knockout* per la 5-LO no van ser resistents a desenvolupar la fibrosi hepàtica induïda per CCl_4 .

Efectes dels inhibidors sobre la biosíntesi d'eicosanoids en els macròfags.

Per caracteritzar les accions farmacològiques dels inhibidors de la COX-2 i la 5-LO a nivell cel·lular, es van realitzar una sèrie d'experiments a macròfags, el principal tipus inflamatori i la principal font de prostaglandines i leucotriens al fetge. Tal i com es va poder demostrar

mitjançant RT-PCR i EIA, els macròfags Raw 264.7 són una bona eina per avaluar la producció d'eicosanoids perquè expressen tots els enzims responsables de la seva síntesi (COX-1, COX-2, 5-LO, FLAP, LTC4S, LTA4H, i 12/15-LO) i generen PGE₂ i LTB₄.

Tal com s'esperava, en aquestes cèl·lules, el SC-236 va inhibir de manera concentració dependent la biosíntesi de PGE₂ i el CJ-13,610 va disminuir dràsticament la del LTB₄.

Per assegurar que els efectes no es devien a la mort de les cèl·lules, es va avaluar la toxicitat dels compostos. El SC-236 i el CJ-13,610 només van afectar a la viabilitat de les cèl·lules a concentracions més grans que les necessàries per inhibir els eicosanoids.

L'inhibidor dual licofelone va inhibir la formació de la PGE₂ i el LTB₄ d'una manera concentració dependent. Però la inhibició sobre la biosíntesi de la PGE₂ va ser menor que la que va produir la combinació de SC-236 i CJ-13,610.

El CJ-13,610 és un inhibidor tipus no-redox de nova aparició i poc caracteritzar en macròfags, per això es va comparar amb el AA-861 (un conegut inhibidor de la 5-LO). La disminució dels nivells de LTB₄ produïda per aquests dos inhibidors va resultar ser similar.

Les vies de la COX-2 i la 5-LO modulen diferencialment l'expressió de mRNA de la IL-6 a macròfags murins.

Com que les vies de la COX-2 i 5-LO regulen les citoquines inflammatòries, es van explorar els efectes d'aquests compostos a l'expressió de la IL-6 en els macròfags Raw 264.7.

Els resultats obtinguts van mostrar que aquestes dues vies tenen efectes contraris en la modulació de la IL-6. Per una banda, la inhibició de la COX-2 amb SC-236 va estimular l'expressió de IL-6. En canvi la inhibició de la 5-LO, tant amb AA-861 com amb CJ-13,610, la va

disminuir significativament. Al combinar els dos inhibidors, SC-236 i CJ-13,610, es van compensar els efectes. Interessantment, la inhibició de les dues vies amb licofelone va augmentar significativament l'expressió de la IL-6.

La modulació de l'expressió de la IL-6 sembla ser mediada per el LTB₄ ja que el CP-105,696, l'antagonista del receptor LTB-1, té el mateix efecte que la inhibició de la 5-LO. En canvi, aquest efecte sembla independent dels cis-LTs ja que l'antagonista del receptor CisLT-1 MK-571 no té cap efecte.

Comparative Protection against Liver Inflammation and Fibrosis by a Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitor and a Nonredox-Type 5-Lipoxygenase Inhibitor

Raquel Horrillo, Anna Planagumà, Ana González-Pérez, Natàlia Ferré, Esther Titos, Rosa Miquel, Marta López-Parra, Jaime L. Masferrer, Vicente Arroyo, and Joan Clària

Department of Biochemistry and Molecular Genetics (R.H., A.P., A.G.-P., N.F., E.T., M.L.-P., J.C.), Pathology Laboratory (R.M.) and Liver Unit (V.A.), Hospital Clínic, Centro de Investigación Biomédica Esther Koplowitz and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain; and Pfizer Global Research & Development, St. Louis Missouri (J.L.M.)

Received July 6, 2007; accepted August 30, 2007

ABSTRACT

In this study, we examined the relative contribution of cyclooxygenase-2 (COX-2) and 5-lipoxygenase (5-LO), two major proinflammatory pathways up-regulated in liver disease, to the progression of hepatic inflammation and fibrosis. Separate administration of 4-[5-(4-chlorophenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzenesulfonamide (SC-236), a selective COX-2 inhibitor, and CJ-13,610, a 5-LO inhibitor, to carbon tetrachloride-treated mice significantly reduced fibrosis as revealed by the analysis of Sirius Red-stained liver sections without affecting necroinflammation. Conversely, combined administration of SC-236 and 4-[3-[4-(2-methylimidazol-1-yl)phenylthio]phenyl-3,4,5,6-tetrahydro-2H-pyran-4-carboxamide (CJ-13,610) reduced both necroinflammation and fibrosis. These findings were confirmed in 5-LO-deficient mice receiving SC-236, which also showed reduced hepatic monocyte chemoattractant protein 1 expression. Interestingly, SC-236 and CJ-

13,610 significantly increased the number of nonparenchymal liver cells with apoptotic nuclei (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling-positive). Additional pharmacological profiling of SC-236 and CJ-13,610 was performed in macrophages, the primary hepatic inflammatory cell type. In these cells, SC-236 inhibited prostaglandin (PG) E₂ formation in a concentration-dependent manner, whereas CJ-13,610 blocked leukotriene B₄ biosynthesis. Of note, the simultaneous addition of SC-236 and CJ-13,610 resulted in a higher inhibitory profile on PGE₂ biosynthesis than the dual COX/5-LO inhibitor licofelone. These drugs differentially regulated interleukin-6 mRNA expression in macrophages. Taken together, these findings indicate that both COX-2 and 5-LO pathways are contributing factors to hepatic inflammation and fibrosis and that these two pathways of the arachidonic acid cascade represent potential targets for therapy.

The cyclooxygenase (COX) pathway is responsible for the conversion of arachidonic acid into prostaglandins (PGs), the most widely recognized mediators of inflammation (Vane and

Botting, 1998). In particular, COX-2, the inducible COX isoform, is a key executor of uncontrolled inflammation and its inhibition represents a major target in the treatment of inflammatory disorders (Fitzgerald and Patrono, 2001). On the other hand, emerging information has indicated the contribution of another pathway of arachidonic acid metabolism, the 5-lipoxygenase (5-LO) pathway, in developing and sustaining inflammation (Samuelsson et al., 1987; Funk, 2001). Through the 5-LO pathway, arachidonic acid is converted into leukotrienes (LTs), including LTB₄, a potent chemotactic

This work was supported in part by grants from the Ministerio de Educación y Ciencia (MEC) (SAF 06/03191) and Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (Ciberehd). R.H. is supported by Generalitat de Catalunya-European Social Funds (2006FI-00091). A.G.-P. is supported by MEC. N.F. and M.L.-P. are under Juan de la Cierva (MEC) and ISCIII contracts, respectively.

Article, publication date, and citation information can be found at <http://jpet.aspetjournals.org>.
doi:10.1124/jpet.107.128264.

ABBREVIATIONS: COX, cyclooxygenase; PG, prostaglandin; 5-LO, 5-lipoxygenase; LT, leukotriene; CCl₄, carbon tetrachloride; FLAP, 5-lipoxygenase-activating protein; SC-236, 4-[5-(4-chlorophenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl] benzenesulfonamide; CJ-13,610, 4-[3-[4-(2-methylimidazol-1-yl)phenylthio]phenyl-3,4,5,6-tetrahydro-2H-pyran-4-carboxamide; MTT, 3-[4,5-dimethylthiazoyl-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; DMSO, dimethyl sulfoxide; LPS, lipopolysaccharide; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; AA-861, (2-(12-hydroxydodeca-5,10-dinyl)-3,5,6-trimethyl-1,4-benzoquinone); MK-571, 3-[[3-[2-(7-chloroquinolin-2-yl)vinyl]phenyl]-(2-dimethylcarbamoyl)ethylsulfanyl]propionic acid; EIA, enzyme immunoassay; IL, interleukin; MCP-1, monocyte chemoattractant protein 1; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling; CP-105,696, 1-[3-(4-phenylbenzyl)-4-hydroxy-chroman-7-yl] cyclopentane carboxylic acid; RT, reverse transcription; PCR, polymerase chain reaction; LTC₄S, leukotriene C₄ synthase; LTA₄H, leukotriene A₄ hydrolase.

agent for leukocytes, and cysteinyl-LTs (LTC₄, LTD₄, and LTE₄), which are potent mediators of allergic and hypersensitivity reactions (Samuelsson et al., 1987; Funk, 2001). The fact that COX-2- and 5-LO-derived products are directly implicated in inflammation has fostered the development of drugs that directly target the formation of PGs and LTs or their binding to specific receptors. The current availability of these pharmacological tools provides new opportunities in inflammation therapy.

Recent evidence indicate that the COX-2 and 5-LO pathways have converging functions in liver inflammation, tissue remodeling, and fibrosis (Titos et al., 2000, 2003, 2005; Yamamoto et al., 2003; Núñez et al., 2004; Planagumà et al., 2005). Indeed, COX-2 expression is up-regulated in patients with chronic liver disease and closely correlates with progressive fibrosis in patients with hepatitis C infection (Cheng et al., 2002a; Mohammed et al., 2004; Núñez et al., 2004). COX-2 expression is also up-regulated in rats with carbon tetrachloride (CCl₄)-induced liver injury and in experimental models of alcoholic liver disease and steatohepatitis (Nanji et al., 1997; Planagumà et al., 2005; Yu et al., 2006). Recently, Yu et al. (2007) have shown that the expression of a human COX-2 transgene in murine liver causes hepatitis. Importantly, COX-2 inhibition reduces cell growth and triggers apoptosis in hepatic stellate cells and exerts antifibrogenic actions *in vivo* (Cheng et al., 2002b; Yamamoto et al., 2003; Planagumà et al., 2005). Similar to COX-2, the up-regulation of 5-LO has been reported in patients with chronic liver disease and in experimental models of liver injury (Uemura et al., 1994; Titos et al., 2000). 5-LO-derived products have been shown to activate hepatic stellate cells, and inhibition of their formation induces apoptosis in Kupffer cells, the major inflammatory cell type in the liver (Titos et al., 2000, 2003). Finally, blockade of the 5-LO pathway with a 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP) inhibitor protects the liver from experimental necroinflammatory damage and fibrosis (Titos et al., 2003, 2005).

Although both COX-2 and 5-LO seem to be implicated in liver injury, at present the exact contribution of each pathway to the initiation and progression of liver inflammation and fibrosis is uncertain. In the current study we assessed the relative contribution of COX-2 and 5-LO pathways to liver inflammation and fibrosis by administering a selective COX-2 inhibitor (SC-236) and a nonredox-type 5-LO inhibitor (CJ-13,610), either alone or in combination, to mice with CCl₄-induced liver injury. Additional studies were performed in 5-LO-deficient mice, as a genetic model of 5-LO inhibition, as well as in murine macrophages, as a relevant model of inflammatory cell type.

Materials and Methods

Materials. Male 129S2/SvPasCrl mice were purchased from Charles River Laboratories (Saint Aubin les Elseuf, France). 5-LO knockout mice (129-*Alox5^{tm1Fun}*) were from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Murine Raw 264.7 macrophages were purchased from European Collection of Cell Cultures (Salisbury, UK). CCl₄, olive oil, polyethylene glycol, hydrogen peroxide, MTT, DMSO, LPS, ionophore A23187, PMA, Direct Red 80 (Sirius Red), picric acid, thiocarbazine, proteinase K, ethidium bromide, and Dulbecco's modified Eagle's medium were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Tris was from Merck (Darmstadt, Germany). Isoflurane was from Abbott Laboratories (Abbott Park, IL). AA-861 was from BI-

OMOL Research Laboratories (Plymouth Meeting, PA). MK-571 and LTB₄ and PGE₂ enzyme immunoassay (EIA) kits were purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). RNAqueous and DNA-free kits were from Ambion (Austin, TX). Penicillin-streptomycin, trypsin-EDTA, RPMI 1640 medium without phenol red, and 1Kb Plus DNA Ladder were from Invitrogen (Carlsbad, CA). L-Glutamine was from Biological Industries (Kibbutz Beit Haemek, Israel). Dulbecco's phosphate-buffered saline was purchased from BioWhittaker (now Cambrex Bio Science., East Rutherford, NJ). Fetal bovine serum was from Biowest (Nuaille, France). In Situ Cell Death Detection kit (POD) and diaminobenzidine substrate were from Roche Diagnostics (Basel, Switzerland). Agarose was from Serva (Heidelberg, Germany). The high-capacity archive kit, interleukin-6 (IL-6), monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), and β -actin assays-on-demand were from Applied Biosystems (Foster City, CA).

Animal Studies. 129S2/SvPasCrl mice were assigned to four different groups (nine mice each) that received placebo, a COX-2 inhibitor (SC-236), a nonredox-type 5-LO inhibitor (CJ-13,610), or a combination of SC-236 plus CJ-13,610. SC-236 was given in the drinking water at a dose of 6 mg/kg (Kishi et al., 2000). To achieve this dose, SC-236 was dissolved in a stock solution of 5% Tween 20 and 95% polyethylene glycol and diluted in distilled water to achieve a final SC-236 concentration of 0.045 mg/ml. CJ-13,610 was given in the diet at a dose of 10 mg/kg. The CJ-13,610-containing diet was prepared by PMI Nutrition International (Brentwood, MO). After 1 week of drug administration, mice received *i.p.* injections of CCl₄ (1 ml/kg in olive oil, twice a week) for 8 weeks. Thereafter, animals were sacrificed, and liver samples were either fixed in 10% formalin or snap-frozen in N₂.

Additional studies were performed in 5-LO-deficient (129-*Alox5^{tm1Fun}*, $n = 15$) and wild-type (129S2/SvPasCrl, $n = 14$) mice (The Jackson Laboratory), that were divided in four experimental groups: wild-type plus placebo, wild-type plus SC-236, 5-LO-deficient plus placebo, and 5-LO-deficient plus SC-236. Mice were sacrificed after 6 weeks, and liver samples collected as described above.

All animal studies were conducted in accordance with the criteria of the Investigation and Ethics Committee of the Hospital Clinic and the European Community laws governing the use of experimental animals.

Histological Analysis. Liver samples were formalin-fixed, embedded in paraffin, sectioned (5 μ m), and stained with hematoxylin-eosin. Necroinflammation was scored by a registered pathologist (R.M.) unaware of the treatments as grade 0 (absent), grade 1 (spotty necrosis), grade 2 (confluent necrosis), and grade 3 (bridging necrosis). Liver fibrosis was assessed by Sirius Red staining. In brief, liver sections were incubated for 10 min with thiosemicarbazide (0.5%), stained in Sirius Red F3B (0.1%) in saturated picric acid for 1 h, and subsequently washed with acetic acid (0.5%). Sections were visualized under a microscope (Eclipse E600; Nikon, Kawasaki, Japan), and the fibrosis area quantified by morphometry using a computerized system (AnalysisSIS, Munster, Germany).

TUNEL Assay. Apoptosis in liver sections (5 μ m) was determined by TUNEL assay (Roche Diagnostics). Enzymatic labeling was performed after blocking the endogenous peroxidase in 3% H₂O₂ for 20 min and after proteinase K treatment (20 μ g/ml in HCl-Tris) for 20 min. The fluorescent signal was converted into a chromogenic signal by adding diaminobenzidine. Finally, slides were counterstained with hematoxylin-eosin. The number of nonparenchymal TUNEL-positive cells was counted in a total of 20 fields/tissue section under the microscope (200 \times magnification).

Analysis of Eicosanoids. PGE₂ and LTB₄ concentrations in cell supernatants were determined in unextracted samples by EIAs.

Cell Incubations. Raw 264.7 cells were grown in 150 cm² flasks in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 50 U/ml penicillin, and 50 μ g/ml streptomycin. All incubations were performed in cells under the 16th passage. Cells were transferred to 12-well plates at a density of 200,000 cells/well in complete medium, and incubations were per-

formed under a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37°C. In experiments assessing the effects of compounds on PGE₂ biosynthesis, cells were primed with LPS (500 ng/ml) to induce a sustained expression of COX-2 mRNA and protein, as described previously for macrophages (Barrios-Rodiles et al., 1999). Twenty-four hours later, cells were washed and incubated with vehicle (0.2% DMSO) or increasing concentrations of the selective COX-2 inhibitor, SC-236 (0.1, 1, and 10 μM) and the dual COX/5-LO inhibitor, licofelone (1, 10, and 30 μM) for 15 min. Thereafter, cells were exposed to ionophore A23187 (2–5 μM) for an additional 15 min to stimulate the production of arachidonic acid metabolites (Kouzan et al., 1985). To test the effects on LTB₄ biosynthesis, cells were directly incubated with vehicle (0.2% DMSO), increasing concentrations of the 5-LO inhibitors CJ-13,610 (0.1, 1, and 10 μM) and AA-861 (1, 10, and 15 μM) or licofelone (1, 10, and 30 μM) for 15 min and subsequently stimulated with ionophore A23187 (2–5 μM) for an additional 15 min. In some experiments, CJ-13,610 (1 μM) or AA-861 (10 μM) were combined with SC-236 (1 μM).

For gene expression analysis, Raw 264.7 cells were grown in six-well plates (500,000 cells/well) in serum-free medium. Twenty-four hours later, cells were incubated with vehicle (0.1% DMSO), SC-236 (3 μM), CJ-13,610 (1 μM), AA-861 (10 μM), licofelone (30 μM), the LTB₄ receptor (LTB1) antagonist CP-105,696 (0.1 μM), or the LTD₄ receptor (Cys-LT1) antagonist MK-571 (1 μM) for 2 h at 37°C and then stimulated with PMA (50 nM) and ionophore (2 μM) for additional 4 h. In some incubations, the compounds were combined with SC-236 (3 μM). The concentrations of SC-236, CJ-13,610, and AA-861 were selected from previous studies demonstrating effective inhibition of either COX-2 or 5-LO activity (Titos et al., 2003; Fischer et al., 2004; López-Parra et al., 2005). The concentrations of CP-105,696 and MK-571 were selected from previous publications demonstrating selective blockade of LTB₄ and LTD₄ receptors, respectively (Titos et al., 2000; Huang et al., 2004). The licofelone concentration was selected from Tries et al. (2002), Marcouiller et al. (2005), and Vidal et al. (2007).

Cell Viability Assay. Raw 264.7 macrophages were seeded in 24-well plates (100,000 cells/well) and incubated with vehicle (0.2% DMSO), SC-236 (0.1, 1, 10, and 50 μM), or CJ-13,610 (0.1, 1, 10, and 50 μM) for 1 h at 37°C. Cell viability was tested by addition of 100 μl of MTT (5 mg/ml stock solution) to each well for 3 h and subsequent lysis with isopropyl alcohol and shaking for 20 min. The absorbance at 570 nm was measured in a multiwell plate reader (BMG Labtech, Offenburg, Germany) and cell number was calculated from a standard curve.

Gene Profiling by RT-PCR. RNA was isolated using the RNAqueous kit. RNA concentration was assessed in a UV spectrophotometer, and its integrity was tested in a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Samples were digested with DNase and retrotranscribed with the high-capacity cDNA archive kit. PCR amplifica-

tion of COX-1, COX-2, 5-LO, FLAP, LTC₄ synthase (LTC4S), LTA₄ hydrolase (LTA4H), and 12/15-LO was performed with specific oligonucleotides (Table 1). The specificity of primers was confirmed in the GenBank database using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) and by direct sequencing of the amplified PCR products in an ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer using a Big Dye Terminator version 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). PCR products were analyzed by electrophoresis in 1.5% agarose gels and visualized by ethidium bromide staining.

Analysis of Gene Expression by RT and Real-time PCR. Real-time quantitative PCR was performed in an ABI Prism 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Ready-to-use primer and probe sets (TaqMan Gene Expression Assays) were used to quantify MCP-1 and IL-6 gene expression using β-actin as an endogenous control. PCR results were analyzed with Sequence Detector Software (version 2.1; Applied Biosystems). Relative quantification of gene expression was performed using the comparative Ct method. The amount of target gene, normalized to β-actin and relative to a calibrator, was determined by the arithmetic formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ described in the Comparative Ct Method (User Bulletin #2; <http://docs.appliedbiosystems.com/pebi/docs/04303859.pdf>).

Statistical analysis of the results was performed using analysis of variance and unpaired Student's *t* test. Results are expressed as means ± S.E.M., and differences were considered significant at *P* < 0.05.

Results

There were no significant differences in food intake, body weight gain, and relative liver weight among the different groups of the study (data not shown). Histological examination of hematoxylin-eosin-stained sections revealed that CCl₄-treated mice had massive and severe hepatocyte necrosis, inflammation, and ballooning at the centrilobular zone with bridging of necrosis that severely disrupted the sinusoidal and lobular architecture of the liver (Fig. 1A). In these animals, the selective COX-2 inhibitor, SC-236, or the potent 5-LO inhibitor, CJ-13,610, administered separately did not significantly modify necroinflammatory damage (Fig. 1A). In contrast, a significant reduction in necroinflammatory injury was observed after the simultaneous administration of SC-236 and CJ-13,610 (Fig. 1A). On the other hand, the examination of Sirius Red-stained sections revealed that CCl₄-treated mice had extensive collagen deposition with septa bridging portal regions (Fig. 1B). The administration of SC-236 significantly reduced the percentage of fibrosis area (Fig. 1B). A similar reduction of fibrosis area was observed with

TABLE 1
List of primers for RT-PCR

Gene	GenBank Accession No.		Sequence Primers	Expected Product Size base pairs
COX-1	NM_008969	F	5'-TCCCAGGGGCTGATGCTCTTCTC-3'	386
		R	5'-CACCAGTGCCTCAACCCCATAGTC-3'	
COX-2	NM_011198	F	5'-CAAGCAGTGGCAAAGGCCTCCA-3'	459
		R	5'-GGCACTTGCATGTGATGGTGGCT-3'	
5-LO	NM_009662	F	5'-CCCCGAAGCTCCAGTGACC-3'	492
		R	5'-TCCCAGGCCTAGTGTGATA-3'	
FLAP	NM_009663	F	5'-GGACCGGGACTCTTGCCCTTGA-3'	339
		R	5'-GCGGGGAGATCGTCGTGCTTAC-3'	
LTC4S	NM_008521	F	5'-GCTGGCAATATGAAGGACGAAGTG-3'	141
		R	5'-TCGCTCGCCGGACGCTGAC-3'	
LTA4H	NM_008517	F	5'-GTGGCGAGGAACACAGCGAAAGTA-3'	330
		R	5'-CGATGGCCTGGCACTGACTGAAGA-3'	
12/15-LO	NM_007440	F	5'-CCCACCGCCGATTTCCACG-3'	333
		R	5'-AGTCCTCGCTCAGCCAATCATCA-3'	

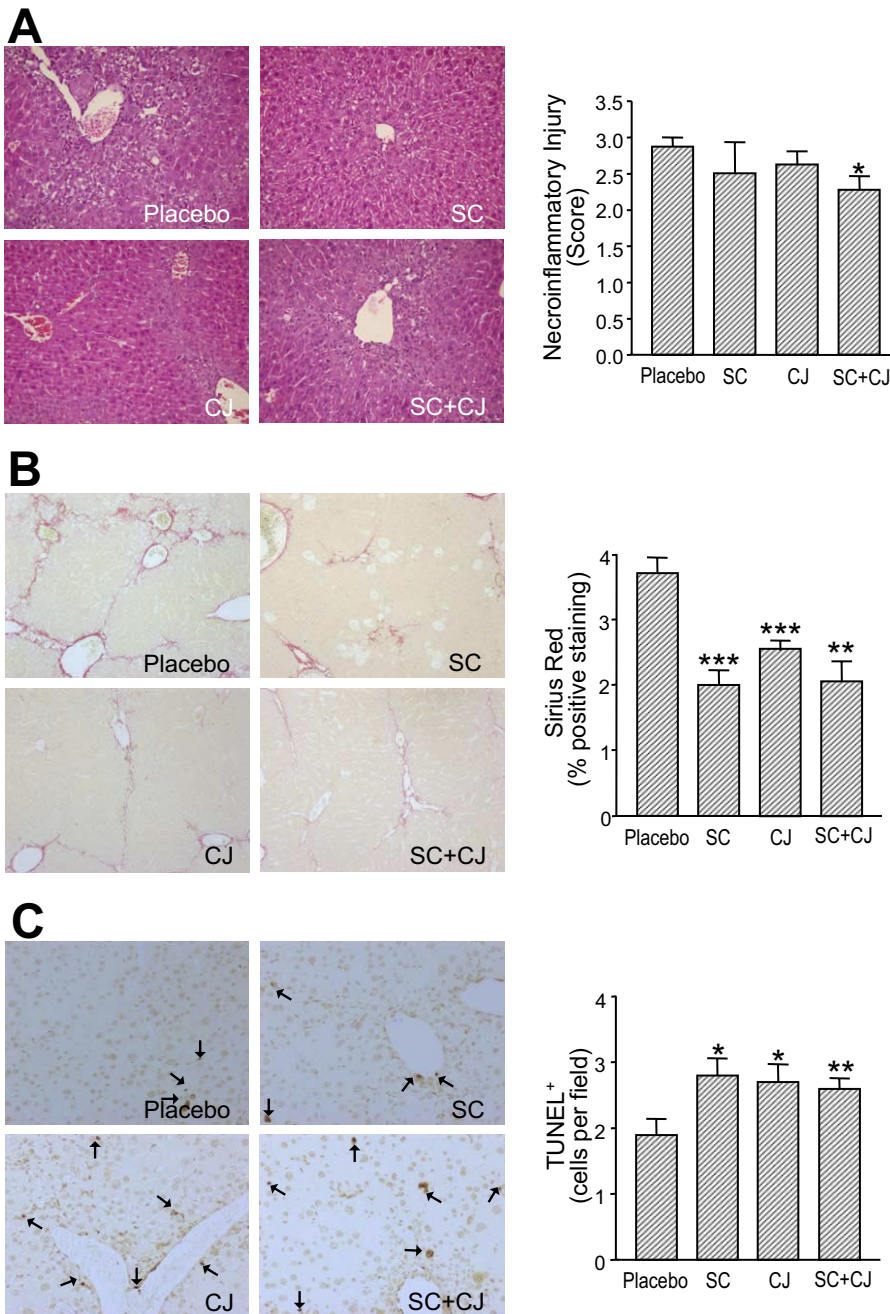


Fig. 1. Effects of selective inhibition of the COX-2 and 5-LO pathways in CCl_4 -treated mice. **A**, effects on necroinflammatory liver injury. Representative photomicrographs ($100\times$ magnification) of liver sections stained with hematoxylin-eosin from 8-week CCl_4 -treated mice receiving either placebo ($n = 9$), the selective COX-2 inhibitor, SC-236 (SC) ($n = 9$), the 5-LO inhibitor, CJ-13,610 (CJ) ($n = 9$), or a combination therapy of SC-236 and CJ-13,610 (SC+CJ) ($n = 9$). The hepatocellular damage observed in hematoxylin-eosin-stained liver sections was analyzed by a registered pathologist and scored as described under *Materials and Methods*. **B**, effects on liver fibrosis. Representative photomicrographs ($100\times$ magnification) of Sirius Red-stained liver sections from 8-week CCl_4 -treated mice receiving either placebo, SC-236 (SC), CJ-13,610 (CJ), or a combination therapy of SC-236 and CJ-13,610 (SC+CJ). **C**, effects on nonparenchymal liver cell apoptosis. Representative images ($200\times$ magnification) of apoptotic nonparenchymal liver cells assessed by the TUNEL assay in 8-week CCl_4 -treated mice receiving either placebo, SC-236 (SC), CJ-13,610 (CJ), or a combination therapy of SC-236 and CJ-13,610 (SC+CJ). TUNEL⁺ nuclei in liver sections are denoted by arrows. Results are expressed as means \pm S.E.M. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ versus placebo group.

CJ-13,610, either alone or in combination with SC-236 (Fig. 1B). As shown in Fig. 1C, these antifibrogenic actions were associated with an induction of nonparenchymal cell apoptosis. Indeed, an increased number of TUNEL-positive nuclei were observed in nonparenchymal liver cells from mice receiving SC-236 and CJ-13,610, either separately or in combination (Fig. 1C).

We next compared the effects of pharmacological inhibition of 5-LO with those exerted by the genetic inhibition of this pathway. In 5-LO-deficient mice, we confirmed that inhibition of a single pathway is not enough for preventing hepatic necroinflammation induced by CCl_4 . Indeed, hepatocellular damage was significantly reduced only in 5-LO-deficient mice receiving SC-236 but not in wild-type mice receiving SC-236 or in mice lacking the 5-LO gene (Fig. 2, left panels). Consistent with these findings, expression of hepatic MCP-1,

a potent chemoattractant protein that contributes to the maintenance of the inflammatory infiltrate during liver injury (Efsen et al., 2001), was only significantly down-regulated in 5-LO-deficient mice receiving SC-236 (Fig. 2, middle panels). Hepatic fibrosis was reduced to a similar extent by SC-236 in both wild-type and 5-LO-deficient mice (Fig. 2, right panels). 5-LO-deficient mice were not resistant to CCl_4 -induced fibrosis (Fig. 2, right panels). Given that COX-2-deficient mice exhibit decreased fertility and survival, we were unable to perform similar studies in these mice.

To characterize the pharmacological actions of COX-2 and 5-LO inhibitors at the cellular level, we set out a series of experiments in macrophages, the primary inflammatory cell type and the main source of PGs and LTs in the liver (Decker, 1990). As shown in Fig. 3A, Raw 264.7 macrophages expressed all key enzymes of eicosanoid biosynthesis, namely

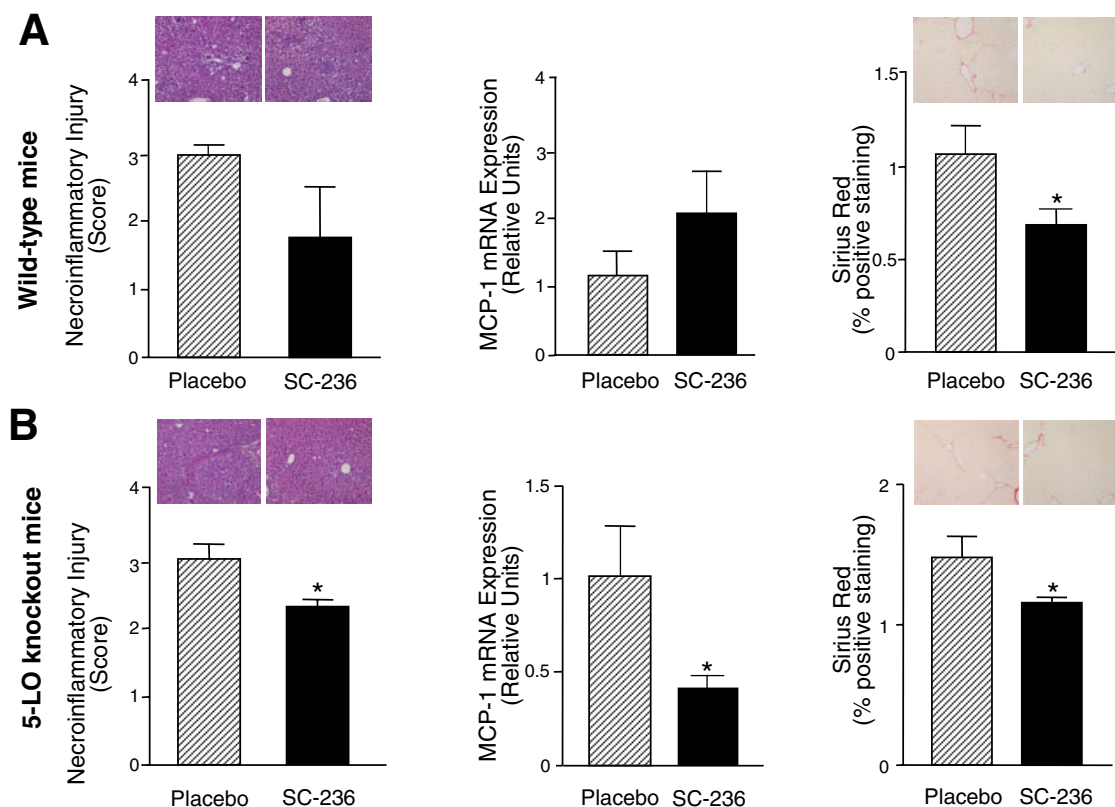


Fig. 2. Effects of selective COX-2 inhibition in wild-type (A) and 5-LO-deficient mice (B) treated with CCl₄. Necroinflammation (left panels) was analyzed in hematoxylin-eosin-stained liver sections from mice that received placebo or the selective COX-2 inhibitor, SC-236, during the 6 weeks of CCl₄ treatment. Insets, representative photomicrographs (100× magnification) of liver sections stained with hematoxylin-eosin. MCP-1 mRNA expression (middle panels) was determined by reverse transcription quantitative PCR in liver samples from mice treated with placebo or SC-236. Fibrosis (right panels) was assessed by Sirius Red staining of liver sections from mice that received placebo or SC-236. Insets, representative photomicrographs (100× magnification) of liver sections stained with Sirius Red. Data are representative of 29 mice. Results are expressed as means ± S.E.M. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ versus placebo.

COX-1, COX-2, 5-LO, FLAP, LTC₄S, LTA₄H, and 12/15-LO. Consistent with these findings, these cells generated PGE₂ and LTB₄, two proinflammatory products derived from COX and 5-LO pathways, respectively (Fig. 3, B and C). SC-236 inhibited in a concentration-dependent manner PGE₂ biosynthesis (Fig. 3B), whereas CJ-13,610 markedly blocked LTB₄ formation (Fig. 3C). SC-236 and CJ-13,610 only affected macrophage viability at concentrations higher than those necessary to inhibit PGE₂ and LTB₄ formation (Fig. 3D). In addition, we compared the effects of SC-236 and CJ-13,610 with those of the dual COX/5-LO inhibitor, licofelone. As shown in Fig. 3E, licofelone inhibited PGE₂ and LTB₄ formation in a concentration-dependent manner. However, the inhibitory profile of this drug on PGE₂ biosynthesis was lower than that produced by the combination of SC-236 and CJ-13,610 (Table 2). Finally, given that CJ-13,610 is a nonredox-type 5-LO inhibitor of recent development poorly characterized in macrophages, we compared its inhibitory properties with those of a well known inhibitor (i.e., AA-861) (Titos et al., 2003). As shown in Table 3, CJ-13,610 inhibited 5-LO activity, estimated by LTB₄ production, to an extent similar to that of AA-861.

We next explored the effects of drugs on macrophage IL-6 expression, as COX-2 and 5-LO are known to regulate cytokine secretion in these cells (Sipe et al., 1992; Marcouiller et al., 2005). As shown in Fig. 4A, SC-236 and CJ-13,610 had opposite effects on the expression of this cytokine. On one

hand, SC-236 further stimulated IL-6 expression, whereas on the other hand, CJ-13,610 significantly down-regulated its expression (Fig. 4A). AA-861 reproduced the inhibitory actions seen with CJ-13,610 (Fig. 4A). SC-236 abrogated the inhibitory effect on IL-6 expression exerted by CJ-13,610 but not that exerted by AA-861 (Fig. 4A). The modulation of IL-6 expression by 5-LO appeared to be mediated by LTB₄ as CP-105,696, a BLT1 receptor antagonist, but not MK-571, a Cys-LT1 receptor antagonist, significantly reduced IL-6 expression (Fig. 4B). Of note, licofelone significantly up-regulated IL-6 mRNA expression (Fig. 4C).

Discussion

In this study, we provide evidence that both the COX-2 and 5-LO pathways are contributing factors in the initiation and progression of liver damage in a murine model of CCl₄-induced injury and that these two proinflammatory pathways represent potential targets for therapy. Our findings are consistent with previous studies showing increased expression and enhanced formation of COX-2- and 5-LO-derived products in patients with chronic liver disease and progressive fibrosis (Uemura et al., 1994; Cheng et al., 2002a; Mohammed et al., 2004; Núñez et al., 2004) and in experimental models including CCl₄-induced liver injury, alcoholic liver disease, and diet-induced steatohepatitis (Nanji et al., 1997; Titos et al., 2000, 2003, 2005; Planagumà et al., 2005; Yu et

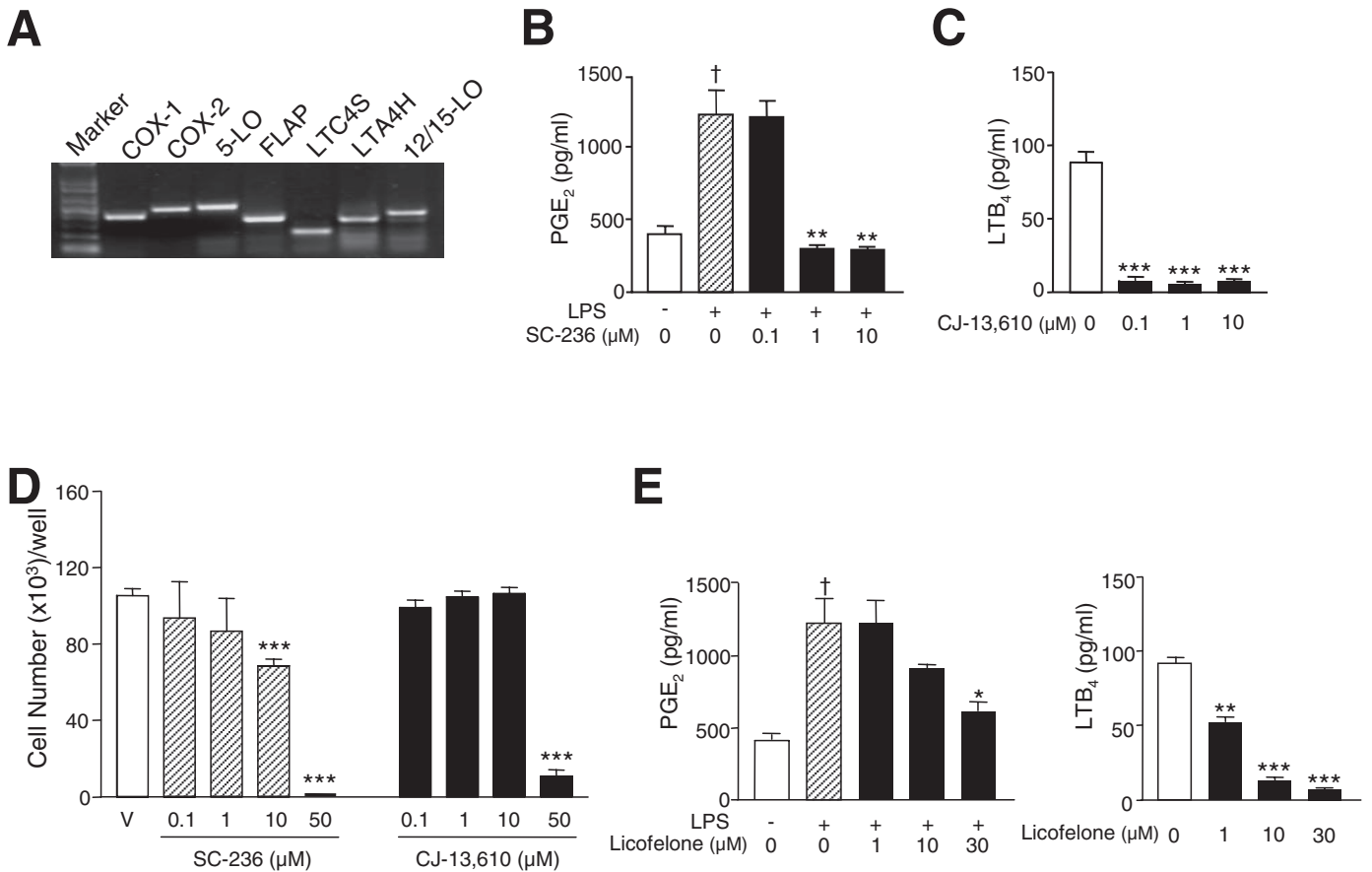


Fig. 3. Modulation of eicosanoid biosynthesis in murine macrophages. A, representative RT-PCR analysis of COX-1, COX-2, 5-LO, FLAP, LTC4S, LTA4H, and 12/15-LO mRNA expression in unstimulated murine Raw 264.7 cells. A 1Kb Plus DNA Ladder was used as a size standard. B, effects of SC-236 on PGE₂ production. Raw 264.7 cells were exposed to LPS (500 ng/ml) for 24 h, incubated with vehicle (0.2% DMSO) or SC-236 (0.1, 1, and 10 μ M) for 15 min, and subsequently stimulated with ionophore A23187 (2 μ M) for an additional 15 min in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C. PGE₂ levels were determined by EIA. C, effects of CJ-13,610 on LTB₄ production. Raw 264.7 cells were incubated with vehicle (0.2% DMSO) or CJ-13,610 (0.1, 1, and 10 μ M) for 15 min and subsequently stimulated with ionophore A23187 (5 μ M) for an additional 15 min at 37°C. LTB₄ was determined by EIA. D, effects of SC-236 and CJ-13,610 on cell viability. Raw 264.7 cells were treated with vehicle (0.2% DMSO), SC-236, or CJ-13,610 for 1 h at 37°C, and cell numbers were evaluated by the MTT assay as described under *Materials and Methods*. E, effects of the dual COX/5-LO inhibitor licofelone on PGE₂ and LTB₄ production. To assess the effects on PGE₂ production, cells were exposed to LPS (500 ng/ml) for 24 h and then incubated with licofelone (1, 10, and 30 μ M) for 15 min and subsequently stimulated with ionophore A23187 (2 μ M) for an additional 15 min in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C. To assess the effects on LTB₄ production, cells were directly incubated with licofelone for 15 min and subsequently stimulated with ionophore A23187 (5 μ M) for an additional 15 min. PGE₂ and LTB₄ levels were determined by EIA. Results are expressed as the mean \pm S.E.M. of three to four different experiments performed in duplicate. †, $P < 0.05$ with respect to untreated cells. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, with respect to cells not exposed to the inhibitor (0 μ M concentration).

TABLE 2

Comparison of the inhibitory effects between licofelone and the combination of SC-236 and CJ-13,610 on PGE₂ and LTB₄ formation. Raw 264.7 cells were incubated with licofelone (30 μ M) or a combination of SC-236 (1 μ M) and CJ-13,610 (1 μ M). Results are expressed as percent inhibition of PGE₂ or LTB₄ formation with respect to vehicle.

	% Inhibition	
	PGE ₂	LTB ₄
SC-236 + CJ-13,610	91.5 \pm 0.1	90.4 \pm 3.1
Licofelone	49.9 \pm 6.2*	90.8 \pm 0.6

* $P < 0.01$ for licofelone versus SC-236 + CJ-13,610.

al., 2006). Moreover, our results underscore previous studies showing protective effects of selective COX-2 and FLAP inhibitors in the liver (Endoh et al., 1996; Yamamoto et al., 2003; Planagumà et al., 2005; Titos et al., 2005).

An interesting finding of the current study was that in addition to reducing fibrosis, the simultaneous inhibition of the COX-2 and 5-LO pathways significantly reduced necro-

TABLE 3

Comparison of the inhibitory effects between CJ-13,610 and AA-861 on LTB₄ biosynthesis

Results are expressed as percent inhibition of LTB₄ formation with respect to vehicle

	% Inhibition LTB ₄ Biosynthesis			
	0.1 μ M	1 μ M	10 μ M	15 μ M
CJ-13,610	91.5 \pm 2.2	93.4 \pm 1.9	90.7 \pm 3.1	N.D.
AA-861	N.D.	95.0 \pm 1.0	88.2 \pm 2.2	95.8 \pm 1.3

N.D., not determined.

inflammatory liver injury. This effect was not observed after the separate administration of each inhibitor. This result is somewhat surprising because previous studies have shown that necroinflammatory liver injury, assessed by transaminases levels, is reduced after the administration of a COX-2 inhibitor to rats (Yamamoto et al., 2003). Whether species differences and/or differential drug properties may explain these divergent findings remains unknown at present. In any event, the protective effects of combined inhibition of COX-2

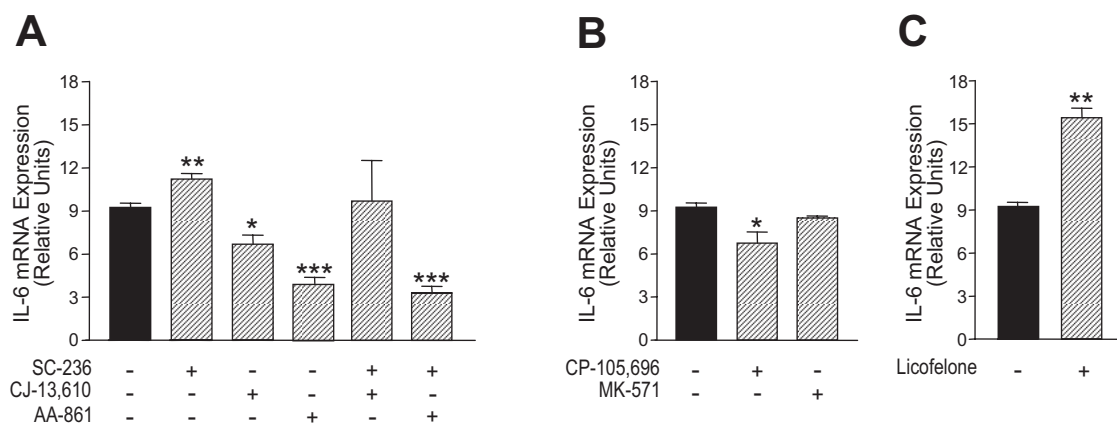


Fig. 4. Modulation of IL-6 mRNA expression in murine macrophages. **A**, Raw 264.7 cells were incubated with vehicle (0.2% DMSO), SC-236 (3 μ M), CJ-13,610 (1 μ M), or AA-861 (10 μ M) for 2 h and subsequently exposed to PMA (50 nM) and ionophore A23187 (2 μ M) for an additional 4 h in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37°C. IL-6 mRNA expression was determined by reverse transcription real-time quantitative PCR. **B**, IL-6 expression was determined in cells incubated with vehicle (0.2% DMSO), the BLT1 receptor antagonist CP-105,696 (0.1 μ M), or the Cys-LT1 receptor antagonist MK-571 (1 μ M) for 2 h and stimulated with PMA and ionophore A23187 as described in **A**. **C**, data from cells incubated with vehicle (0.2% DMSO) or the dual COX/5-LO inhibitor licoferlone (30 μ M). Results are the mean \pm S.E.M. of three to six experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, with respect to vehicle.

and 5-LO pathways were confirmed by administering the COX-2 inhibitor to 5-LO-deficient mice. Unfortunately, these results could not be confirmed in COX-2-deficient mice because these animals exhibit markedly decreased fertility and survival. Overall, these findings open new avenues for the application of dual inhibitors with the ability to inhibit both the COX-2 and 5-LO pathways. In fact, dual inhibitors, such as the COX/5-LO inhibitor licoferlone, have been shown to be efficacious in the treatment of inflammatory disorders such as arthritis, osteoarthritis, asthma, and inflammatory bowel disease (Martel-Pelletier et al., 2003; Vidal et al., 2007). Whether dual inhibitors have superior efficacy compared with inhibition of a single pathway has not been completely proven, but dual inhibitors may prevent the observed shunting of the arachidonic acid metabolism toward the 5-LO pathway after COX inhibition (Martel-Pelletier et al., 2003). In addition, dual inhibitors appear to exert some disease-modifying activity and, for example, they may stop disease progression by reducing the expression of matrix metalloproteinase-13 and IL-1 β (Celotti and Durand, 2003). Moreover, dual inhibitors have an excellent gastrointestinal profile, much better than that for conventional nonsteroidal anti-inflammatory drugs and equivalent to that of selective COX-2 inhibitors (Laufer et al., 1994; Wallace et al., 1994).

Another interesting finding of our study was that pharmacological COX-2 inhibition in 5-LO-deficient mice resulted in a reduction of hepatic MCP-1 expression. MCP-1, also known as CCL2, is a prototype of the C-C chemokine β subfamily and exhibits potent chemotactic activity for monocytes, lymphocytes, and mesenchymal cells, including hepatic stellate cells (Marra et al., 1999; Muller, 2001). Mounting evidence indicates that 5-LO products, particularly LTB₄, strongly induce expression of MCP-1 mRNA and protein and that COX-derived products modulate MCP-1 expression in an agonist-specific fashion (Efsen et al., 2001; Huang et al., 2004). Considering that increased MCP-1 expression contributes to the development of the inflammatory response in patients with active fibrogenesis (Marra et al., 1998), down-regulation of this proinflammatory chemokine may be regarded as an additional protective action associated with the simultaneous

inhibition of the COX-2 and 5-LO pathways. In fact, a recent study has demonstrated that dual COX/5-LO inhibition attenuates monocyte recruitment into the arterial wall by mechanisms related to MCP-1 inhibition (Vidal et al., 2007). Along these lines, a reduction in MCP-1 expression after selective COX-2 inhibition consistently ameliorates the severity of inflammation and fibrosis in chronic pancreatitis (Reding et al., 2006).

Our findings support the concept that COX-2 and 5-LO play opposite roles in the regulation of expression of IL-6, a primary proinflammatory cytokine and a determinant factor in triggering the process of hepatic inflammation (McClain et al., 1999). Indeed, in our study we found that COX-2 inhibition amplified IL-6 expression in macrophages, whereas 5-LO inhibition down-regulated IL-6 expression in these cells. These findings are consistent with previous studies showing the potential of COX-2- and 5-LO-derived products to modulate the expression and synthesis of proinflammatory cytokines in monocytes and macrophages (Sipe et al., 1992; Marcouiller et al., 2005). Interestingly, an inhibitory effect similar to that exerted by the 5-LO inhibitor was observed with a BLT₁ receptor antagonist, suggesting the direct involvement of LTB₄ in the regulation of IL-6 expression in macrophages. This finding is in agreement with the view that among the different eicosanoids, 5-LO products and, in particular, LTB₄, are important positive signals for cytokine expression and synthesis in inflammatory cells (Sipe et al., 1992; Marcouiller et al., 2005).

Our data point to the direction that the hepatic effects exerted by SC-236 and CJ-13,610 were mediated by a combination of mechanisms, involving not only inhibition of proinflammatory 5-LO- and COX-2-derived products but also the induction of apoptosis in nonparenchymal cells. Indeed, in our study we noticed that the decrease in liver fibrosis associated with COX-2 and/or 5-LO inhibition was accompanied by a parallel induction of cell death in nonparenchymal cells (i.e., hepatic stellate cells and liver macrophages). These findings are in agreement with previous studies demonstrating that hepatic stellate cells and Kupffer cells in primary culture undergo apoptosis when exposed to either COX-2 or

5-LO inhibitors (Titos et al., 2003; Planagumà et al., 2005). A wealth of evidence indicates that the process of hepatic stellate cell apoptosis is central to stop the progress of liver fibrosis and represents an important antifibrogenic strategy in the liver (Iredale et al., 1998; Friedman and Bansal, 2006). Moreover, consistent with their role in liver injury, partial depletion of Kupffer cells has been shown to prevent hepatic necroinflammatory damage (Duffield et al., 2005; Titos et al., 2005). Finally, other mechanisms independent of direct COX-2 and 5-LO inhibition may potentially be involved in the hepatoprotective actions exerted by SC-236 and CJ-13,610. For example, SC-236 and other selective COX-2 inhibitors appear to display COX-2-independent actions via activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ , a transcription factor that mediates anti-inflammatory and antifibrogenic effects in the liver (Marra et al., 2000; López-Parra et al., 2005). Another potential mechanism by which conventional 5-LO inhibitors may protect against CCl₄-induced liver injury is by interfering with the metabolism of CCl₄ in the hepatic cytochrome P450 or by exerting antioxidant properties. In our case, this possibility is unlikely because CJ-13,610 is a nonredox-type inhibitor of 5-LO devoid of redox and iron ligand properties (Fischer et al., 2004).

In summary, the current study uncovers the participation of both COX-2 and 5-LO pathways in mounting the inflammatory response and subsequent fibrogenesis in a preclinical model of liver disease. Our results support the notion that the COX-2 and 5-LO pathways have converging functions, not only in cell proliferation and neo-angiogenesis (Romano and Clària, 2003), but also in the progression of liver inflammation and fibrosis. Our findings suggest that inhibition of these two proinflammatory pathways represents a potential strategy for prevention of necroinflammatory liver injury and fibrogenesis.

Acknowledgments

SC-236, CJ-13,610 and CP-105,696 were kindly provided by Pfizer (St. Louis, MO).

References

- Barrios-Rodiles M, Tiraloche G, and Chadee K (1999) Lipopolysaccharide modulates cyclooxygenase-2 transcriptionally and posttranscriptionally in human macrophages independently from endogenous IL-1 β and TNF- α . *J Immunol* **163**:963–969.
- Celotti F and Durand T (2003) The metabolic effects of inhibitors of 5-lipoxygenase and of cyclooxygenase 1 and 2 are an advancement in the efficacy and safety of anti-inflammatory therapy. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **71**:147–162.
- Cheng J, Imanishi H, Iijima H, Shimomura S, Yamamoto T, Amuro Y, Kubota A, and Hada T (2002a) Expression of cyclooxygenase 2 and cytosolic phospholipase A₂ in the liver tissue of patients with chronic hepatitis and liver cirrhosis. *Hepatol Res* **23**:185–195.
- Cheng J, Imanishi H, Liu W, Iwasaki A, Ueki N, Nakamura H, and Hada T (2002b) Inhibition of the expression of α -smooth muscle actin in human hepatic stellate cell line, LI90, by a selective cyclooxygenase 2 inhibitor, NS-398. *Biochem Biophys Res Commun* **297**:1128–1134.
- Decker K (1990) Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur J Biochem* **192**:245–261.
- Duffield JS, Forbes SJ, Constandinou CM, Clay S, Partolina M, Vuthoori S, Wu S, Lang R, and Iredale JP (2005) Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J Clin Invest* **115**:56–65.
- Efsen E, Bonacchi A, Pastacaldi S, Valente AJ, Wenzel UO, Tosti-Guerra C, Pinzani M, Laffi G, Abboud HE, Gentilini P, et al. (2001) Agonist-specific regulation of monocyte chemoattractant protein-1 expression by cyclooxygenase metabolites in hepatic stellate cells. *Hepatology* **33**:713–721.
- Endoh T, Tang Q, Denda A, Noguchi O, Kobayashi E, Tamura K, Horiguchi K, Ogasawara H, Tsujiuchi T, Nakae D, et al. (1996) Inhibition by acetylsalicylic acid, a cyclo-oxygenase inhibitor, and *p*-bromophenacylbromide, a phospholipase A₂ inhibitor, of both cirrhosis and enzyme-altered nodules caused by a choline-deficient, L-amino acid-defined diet in rats. *Carcinogenesis* **17**:467–475.
- Fischer L, Steinhilber D, and Wenz O (2004) Molecular pharmacological profile of the nonredox-type 5-lipoxygenase inhibitor CJ-13,610. *Br J Pharmacol* **142**:861–868.
- FitzGerald GA and Patrono C (2001) The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *N Engl J Med* **345**:433–442.
- Friedman SL and Bansal MB (2006) Reversal of hepatic fibrosis—fact or fantasy? *Hepatology* **43**:S82–S88.
- Funk CD (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* **294**:1871–1875.
- Huang L, Zhao A, Wong F, Ayala JM, Struthers M, Ujjainwalla F, Wright SD, Springer MS, Evans J, and Cui J (2004) Leukotriene B₄ strongly increases monocyte chemoattractant protein-1 in human monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**:1783–1788.
- Iredale JP, Benyon RC, McCullen PM, Northrop M, Pawley S, Hovell C, and Arthur MJ (1998) Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. *J Clin Invest* **102**:538–549.
- Kishi K, Petersen S, Petersen C, Hunter N, Mason K, Masferrer JL, Tofilon PJ, and Milas L (2000) Preferential enhancement of tumor radioresponse by a cyclooxygenase-2 inhibitor. *Cancer Res* **60**:1326–1331.
- Kouzan S, Brody AR, Nettesheim P, and Eling T (1985) Production of arachidonic acid metabolites by macrophages exposed in vitro to asbestos, carbonyl iron particles, or calcium ionophore. *Am Rev Respir Dis* **131**:624–632.
- Laufer SA, Augustin J, Dannhardt G, and Kiefer W (1994) (6,7-Diaryldihydropyrrolizin-5-yl)acetic acids, a novel class of potent dual inhibitors of both cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. *J Med Chem* **37**:1894–1897.
- López-Parra M, Clària J, Titos E, Planagumà A, Parrizas M, Masferrer JL, Jiménez W, Arroyo V, Rivera F, and Rodés J (2005) The selective cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib modulates the formation of vasoconstrictor eicosanoids and activates PPAR γ : Influence of albumin. *J Hepatol* **42**:75–81.
- Marcouiller P, Pelletier JP, Guevremont M, Martel-Pelletier J, Ranger P, Laufer S, and Rebol P (2005) Leukotriene and prostaglandin synthesis pathways in osteoarthritic synovial membranes: regulating factors for interleukin 1 β synthesis. *J Rheumatol* **32**:704–712.
- Marra F, DeFranco R, Grappone C, Milani S, Pastacaldi S, Pinzani M, Romanelli RG, Laffi G, and Gentilini P (1998) Increased expression of monocyte chemoattractant protein-1 during active hepatic fibrogenesis: correlation with monocyte infiltration. *Am J Pathol* **152**:423–430.
- Marra F, Efsen E, Romanelli RG, Caligiuri A, Pastacaldi S, Batignani G, Bonacchi A, Caporale R, Laffi G, Pinzani M, et al. (2000) Ligands of peroxisome proliferator-activated receptor γ modulate profibrogenic and proinflammatory actions in hepatic stellate cells. *Gastroenterology* **119**:466–478.
- Marra F, Romanelli RG, Giannini C, Failli P, Pastacaldi S, Arrighi MC, Pinzani M, Laffi G, Montalto R, and Gentilini P (1999) Monocyte chemoattractant protein-1 as a chemoattractant for human hepatic stellate cells. *Hepatology* **29**:140–148.
- Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Rebol P, and Pelletier JP (2003) Therapeutic role of dual inhibitors of 5-LOX and COX, selective and non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Ann Rheum Dis* **62**:501–509.
- McClain CJ, Barve S, Deaciuc I, Kugelmas M, and Hill D (1999) Cytokines in alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis* **19**:205–219.
- Mohammed NA, El Aleem SA, El Hafiz HA, and McMahon RF (2004) Distribution of constitutive (COX-1) and inducible (COX-2) cyclooxygenase in postviral human liver cirrhosis: a possible role for COX-2 in the pathogenesis of liver cirrhosis. *J Clin Pathol* **57**:350–354.
- Muller WA (2001) New mechanisms and pathways for monocyte recruitment. *J Exp Med* **194**:F47–F51.
- Nanji AA, Miao L, Thomas P, Rahemtulla A, Khwaja S, Zhao A, Khwaja S, Tahan SR, and Dannenberg AJ (1997) Dietary saturated fatty acids down-regulate cyclooxygenase-2 and tumor necrosis factor α and reverse fibrosis in alcohol-induced liver disease in the rat. *Hepatology* **26**:1538–1545.
- Núñez O, Fernández-Martínez A, Majano PL, Apolinario A, Gómez-Gonzalo M, Benedicto I, López-Cabrera M, Boscá L, Clemente G, García-Monzón C, et al. (2004) Increased intrahepatic cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 expression is associated with progressive liver disease in chronic hepatitis C virus infection: role of viral core and NS5A proteins. *Gut* **53**:1665–1672.
- Planagumà A, Clària J, Miquel R, López-Parra M, Titos E, Masferrer JL, Arroyo V, and Rodés J (2005) The selective cyclooxygenase-2 inhibitor SC-236 reduces liver fibrosis by mechanisms involving non-parenchymal cell apoptosis and PPAR γ activation. *FASEB J* **19**:1120–1122.
- Reding T, Bimmler D, Perren A, Sun L-K, Fortunato F, Storni F, and Graf R (2006) A selective COX-2 inhibitor suppresses chronic pancreatitis in an animal model (WBN/Kob rats): significant reduction of macrophage infiltration and fibrosis. *Gut* **55**:1165–1173.
- Romano M and Clària J (2003) Cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase converging functions on cell proliferation and tumor angiogenesis: Implications for cancer therapy. *FASEB J* **17**:1986–1995.
- Samuelsson B, Dahlen SE, Lindgren JA, Rouzer CA, and Serhan CN (1987) Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science* **237**:1171–1176.
- Sipe JD, Bartle LM, and Loose LD (1992) Modification of proinflammatory cytokine production by the antirheumatic agents tenidap and naproxen: a possible correlate with clinical acute phase response. *J Immunol* **148**:480–484.
- Titos E, Clària J, Bataller R, Bosch-Marcé M, Ginès P, Jiménez W, Arroyo V, Rivera F, and Rodés J (2000) Hepatocyte-derived cysteinyl leukotrienes modulate vascular tone in experimental cirrhosis. *Gastroenterology* **119**:794–805.
- Titos E, Clària J, Planagumà A, López-Parra M, González-Pérez A, Gaya J, Miquel R, Arroyo V, and Rodés J (2005) Inhibition of 5-lipoxygenase-activating protein abrogates experimental liver injury: role of Kupffer cells. *J Leukoc Biol* **78**:871–874.
- Titos E, Clària J, Planagumà A, López-Parra M, Villamor N, Parrizas M, Carrió A, Miquel R, Jiménez W, Arroyo V, et al. (2003) Inhibition of 5-lipoxygenase induces cell growth arrest and apoptosis in rat Kupffer cells: implications for liver fibrosis. *FASEB J* **17**:1745–1747.

- Tries S, Neupert W, and Laufer S (2002) The mechanism of action of the new antiinflammatory compound ML3000: inhibition of 5-LOX and COX-1/2. *Inflamm Res* **51**:135–143.
- Uemura M, Buchholz U, Kojima H, Kepper A, Hafkemeyer P, Fukui H, Tsujii T, and Keppeler D (1994) Cysteinyl leukotrienes in the urine of patients with liver diseases. *Hepatology* **20**:804–812.
- Vane JR and Botting RM (1998) Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. *Inflamm Res* **47**:S78–87.
- Vidal C, Gómez-Hernández A, Sánchez-Galán E, González A, Ortega L, Gómez-Gerique JA, Tunon J, and Egido J (2007) Licofelone, a balanced inhibitor of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase, reduces inflammation in a rabbit model of atherosclerosis. *J Pharmacol Exp Ther* **320**:108–116.
- Wallace JL, Carter J, McKinght W, Tries S, and Laufer SA (1994) ML 3000 reduces gastric prostaglandin synthesis without causing mucosal injury. *Eur J Pharmacol* **271**:525–531.
- Yamamoto H, Kondo M, Nakamori S, Nagano H, Wakasa K, Sugita Y, Chang-De J, Kobayashi S, Damdinsuren B, Dono K, et al. (2003) JTE-522, a cyclooxygenase-2 inhibitor, is an effective chemopreventive agent against rat experimental liver fibrosis. *Gastroenterology* **125**:556–571.
- Yu J, Hui AY, Chu ES, Cheng AS, Go MY, Chan HL, Leung WK, Cheung KF, Ching AK, Chui YL, et al. (2007) Expression of a Cox-2 transgene in murine liver causes hepatitis. *Gut* **56**:991–999.
- Yu J, Ip E, Dela Pena A, Hou JY, Sessa J, Pera N, Hall P, Kirsch R, Leclercq I, and Farrell GC (2006) COX-2 induction in mice with experimental nutritional steatohepatitis: role as proinflammatory mediator. *Hepatology* **43**:826–836.

Address correspondence to: Dr. Joan Clària, Department of Biochemistry and Molecular Genetics, Hospital Clínic, Villarroel 170, Barcelona 08036, Spain. E-mail: jclaria@clinic.ub.es

II.- ARTICLE 2

La proteïna activadora de la 5-lipooxigenasa (FLAP) modula la inflamació del teixit adipós i la disfunció lipídica a l'obesitat experimental.

Caracterització dels components claus de la via de la 5-LO al teixit adipós.

Primer de tot, es va comprovar que el teixit adipós expressés els enzims de la via de la 5-LO per RT-PCR. El teixit adipós de ratolins salvatges expressa el mRNA de tots els enzims necessaris per a la biosíntesi de LTs: 5-LO, FLAP, LTA4H i LTC4S. A més també expressa els quatre receptors de LT (LTB-1, LTB-2, CisLT-1 i CisLT-2) i l'enzim 12/15-LO.

Per veure si hi havia una contribució diferencial de les cèl·lules del teixit adipós (adipòcits i SVC), es va avaluar l'expressió d'aquests enzims a cada una de les fraccions separadament. Tant els adipòcits com les SVC expressaven tots els enzims i receptors involucrats a la via de la 5-LO.

El teixit adipós de ratolins obesos presenta una sobreexpressió de la FLAP i un augment del LTB_4 .

El teixit adipós de ratolins obesos *ob/ob* presenta un augment significatiu del mRNA de l'enzim de la FLAP respecte al teixit adipós dels ratolins primis salvatges. Consistent amb aquesta sobreexpressió de la FLAP, el teixit adipós dels ratolins obesos tenia incrementats els nivells del producte proinflamatori de la 5-LO LTB_4 , sense canvis als nivells de cis-LT. Aquestes diferències es van fer més evidents amb la incubació d'explants de teixit adipós amb àcid araquidònic exogen i ionòfor. A més, es van perfilar els eicosanoids de la via de la 5-LO produïts per el teixit adipós de ratolins obesos mitjançant un anàlisi amb RP-HPLC. Productes que van

coeluir amb els estàndards de LTB₄ i LTC₄, però no LTD₄, es van detectar després de la incubació del teixit adipós amb àcid araquidònic. Aquests resultats ens indiquen que la via de la 5-LO, especialment l'enzim FLAP i el LTB₄, està modulada per l'obesitat.

Els productes derivats de la 5-LO incrementen l'activitat NF-κB al teixit adipós.

Com que la presència de la inflamació de baix grau al teixit adipós està relacionada amb l'activació transcripcional del NF-κB, es va examinar els efectes dels productes de la 5-LO a la seva activitat. Avaluant la translocació nuclear de les subunitats p50 i p65, es va trobar que concentracions nanomolars de LTB₄ induïen d'una manera concentració depenent l'activitat NF-κB al teixit adipós. El LTD₄ també va ser capaç d'induir l'activitat NF-κB al teixit adipós però amb un increment menor.

El LTB₄ indueix la secreció d'adipoquines al teixit adipós.

Degut a que l'activació de NF-κB estimula la producció de citoquines proinflamatòries, es va analitzar per ELISA els efectes dels leucotriens sobre la producció de MCP-1, IL-6 i TNFα al teixit adipós. L'addició de LTB₄, especialment a una concentració de 10 nM, va induir la producció d'aquestes citoquines característiques del teixit adipós inflammat. Aquest efecte, en canvi, no es va reproduir amb l'addició de LTD₄ als explants.

Degut a aquesta influència sobre les citoquines del LTB₄, es va analitzar el perfil d'adipoquines secretades per aquest teixit en condicions basals i amb l'addició d'aquest producte de la 5-LO.

Sota condicions basals, d'entre les 40 citoquines avaluades a l'*array*, el teixit adipós va secretar al medi 24 i les més abundants van ser: MCP-1, MIP-1γ i IL-6. Incubacions prolongades

d'explants amb LTB₄ van provocar una inducció de l'alliberament de citoquines i quimioquines. Els resultats de l'*array* de citoquines van ser consistents amb els resultats obtinguts per ELISA i sota aquestes condicions, el LTB₄ va incrementar la secreció de IL-6 i MCP-1. A més, el LTB₄ va induir l'alliberament de eotaxina-2, TNFRSF8L i IL-4, que no s'havien detectat sota condicions basals. Aquests canvis a la secreció d'adipoquines semblen ser específics del LTB₄ ja que es van disminuir significativament amb l'addició del U-75302, un antagonista del receptor del LTB₁.

La via de la 5-LO modula el transport dels àcids grassos.

Donat que l'estat d'inflamació de baix grau influencia el metabolisme lipídic a l'adipòcit, es va examinar el paper de la via de la 5-LO a l'entrada i l'alliberament dels àcids grassos lliures a adipòcits primaris i explants de teixit adipós.

Mitjançant adipòcits incubats amb un àcid gras fluorescent unit a BODIPY es va veure que el LTB₄ en disminuïa significativament l'entrada. A més, els efectes del LTB₄ a la captació dels àcids grassos lliures es van prevenir parcialment amb l'addició de l'antagonista del seu receptor. En canvi, el LTD₄ i l'antagonista selectiu del seu receptor, MK-571, no van modificar significativament l'entrada d'àcids grassos a l'interior dels adipòcits.

Els resultats obtinguts amb l'àcid gras fluorescent es van validar amb un àcid gras marcat radioactivament. L'addició de LTB₄ a adipòcits primaris va reduir significativament l'entrada d'àcid oleic tritiat. Aquest efecte inhibitori va ser dependent del temps d'incubació amb un efecte més prominent als 30 segons, on la entrada d'àcids grassos va presentar un màxim.

Consistent amb els efectes del LTB₄ al transport lipídic, la inhibició de la 5-LO (que aconsegueix una reducció del 65% als nivells de LTB₄) als explants de teixit adipós va ser capaç de contrarestar la lipòlisi induïda per isoproterenol (un agonista beta-adrenèrgic). Aquests

resultats ens indiquen que la via de la 5-LO a més d'estar involucrada a la resposta inflamatòria té un paper a la regulació del metabolisme lipídic al teixit adipós.

Estudis amb ratolins induïts a l'obesitat amb l'administració d'una dieta rica en greix.

Per investigar la rellevància d'aquests resultats *in vitro*, es va avaluar els efectes de bloquejar la via de la 5-LO amb un selectiu i potent inhibidor de la FLAP en un model *in vivo* amb ratolins alimentats amb una dieta rica en greix. Els ratolins sotmesos a aquesta dieta durant 12 setmanes mostraven una incrementada adipocitat, caracteritzada per diferències estadísticament significatives al pes corporal, al pes del teixit adipós blanc, a la glucosa sèrica, als nivells d'insulina i la tolerància a la glucosa. En aquest model d'obesitat induïda per dieta, vam observar una expressió elevada de la FLAP i de la LTC₄S, en paral·lel amb un increment de macròfags (F4/80 positius) al teixit adipós i de l'àrea tenyida amb Oil Red-O al fetge, indicatiu d'esteatosi hepàtica accelerada.

Efectes antiinflamatoris i antiesteatòtics de la inhibició de la FLAP als ratolins induïts a obesitat.

L'administració de l'inhibidor de la FLAP Bay-X-1005 als ratolins amb obesitat induïda per dieta va tenir un efecte protector, provocant una reducció significativa a la tinció de macròfags F4/80 al teixit adipós i de l'àrea tenyida amb Oil Red-O al fetge. La inhibició de la via de la 5-LO amb el Bay-X-1005, va aconseguir una reducció selectiva del 60% en la formació de productes de la 5-LO (LTB₄ i cis-LTs) al teixit adipós dels ratolins obesos. A més, els efectes antiinflamatoris i antiesteatòtics provocats per la inhibició de la FLAP es van associar amb una disminució significativa dels nivells circulants d'àcids grassos lliures i insulina, i una millora de la sensibilitat a la insulina.

La via de la 5-LO modula l'activitat AMPK i HSL.

Per entendre els mecanismes moleculars responsables dels efectes protectors de l'inhibidor de la FLAP, Bay-X-1005, vam avaluar els canvis a l'activitat de la AMPK, un sensor i regulador del metabolisme que respon a canvis de l'estat energètic cel·lular. El Bay-X-1005 va incrementar significativament l'activitat AMPK al teixit adipós d'aquests ratolins (mesurada per western blot com els nivells de AMPK fosforilada respecte els nivells de AMPK total). Consistent amb aquest resultat, la incubació d'adipòcits primaris amb LTB₄ va resultar amb una reducció de la fosforilació de AMPK.

A més, l'anàlisi per western blot va mostrar que l'activitat de l'enzim HSL, responsable de la secreció d'àcids grassos lliures per els adipòcits, estava significativament disminuïda al teixit adipós dels ratolins tractats amb Bay-X-1005.

La inhibició de la via de la 5-LO redueix el TNF α i la IL6, i modula el PPAR α .

L'anàlisi per PCR a temps real d'una selecció de gens rellevats del metabolisme lipídic i glucídic va demostrar que el Bay-X-1005 produïa al teixit adipós una disminució significativa de l'expressió d'adipoquines sota el control de AMPK, tals com el TNF α i la IL-6. Aquests resultats van ser confirmats mitjançant ELISA mesurant els nivells d'aquestes citoquines al medi.

Consistent amb aquests resultats, la incubació d'adipòcits 3T3-L1 amb Bay-X-1005 o els antagonistes U-75302 o MK-571 va disminuir l'expressió de TNF α i IL-6.

Per una altra banda, el PPAR α , que és un receptor nuclear regulador del metabolisme dels àcids grassos, es va sobreexpressar significativament al teixit adipós dels ratolins administrats

amb Bay-X-1005. En canvi, no es van observar efectes sobre els gens: MCP-1, adiponectina, resistina, PPAR γ , LPL, ACC, FASN, IRS-1 o GLUT-4.

5-Lipoxygenase Activating Protein Signals Adipose Tissue Inflammation and Lipid Dysfunction in Experimental Obesity

Raquel Horrillo,* Ana González-Pérez,* Marcos Martínez-Clemente,* Marta López-Parra,* Natàlia Ferré,* Esther Titos,*[†] Eva Morán-Salvador,* Ramon Deulofeu,* Vicente Arroyo,^{†,‡} and Joan Clària*[†]

The presence of the so-called low-grade inflammatory state is recognized as a critical event in adipose tissue dysfunction, leading to altered secretion of adipokines and free fatty acids (FFAs), insulin resistance, and development of hepatic complications associated with obesity. This study was designed to investigate the potential contribution of the proinflammatory 5-lipoxygenase (5-LO) pathway to adipose tissue inflammation and lipid dysfunction in experimental obesity. Constitutive expression of key components of the 5-LO pathway, as well as leukotriene (LT) receptors, was detected in adipose tissue as well as in adipocyte and stromal vascular fractions. Adipose tissue from obese mice, compared with that from lean mice, exhibited increased 5-LO activating protein (FLAP) expression and LTB₄ levels. Incubation of adipose tissue with 5-LO products resulted in NF- κ B activation and augmented secretion of proinflammatory adipokines such as MCP-1, IL-6, and TNF- α . In addition, LTB₄, but not LTD₄, reduced FFA uptake in primary adipocytes, whereas 5-LO inhibition suppressed isoproterenol-induced adipose tissue lipolysis. In mice with dietary obesity, elevated FLAP expression in adipose tissue was paralleled with macrophage infiltration, increased circulating FFA levels, and hepatic steatosis, phenomena that were reversed by FLAP inhibition with Bay-X-1005. Interestingly, FLAP inhibition induced AMP-activated protein kinase phosphorylation in parallel with decreases in hormone-sensitive lipase activity and the expression and secretion of TNF- α and IL-6. Similar effects were observed in differentiated 3T3-L1 adipocytes incubated with either Bay-X-1005 or the selective LTB₄ receptor antagonist U-75302. Taken together, these findings indicate that the 5-LO pathway signals the adipose tissue low-grade inflammatory state and steatogenic potential in experimental obesity. *The Journal of Immunology*, 2010, 184: 3978–3987.

A state of mild subclinical inflammation in the adipose tissue has been associated with features of the metabolic syndrome, including obesity and insulin resistance. Unequivocal evidence has demonstrated that this state of chronic, “low-grade” inflammation is related to abnormal adipokine production

and activation of proinflammatory signaling pathways in adipose tissue (1, 2). Moreover, the low-grade inflammatory state results in a deregulated release of free fatty acids (FFAs) from adipose tissue (1, 2). Accumulating data indicate that excessive release of adipokines and increased production of FFAs play an important role in the pathogenesis of obesity-related complications in peripheral tissues, including liver (3). In fact, one of the major metabolic consequences of obesity-driven inflammation and increased FFA efflux to the liver is hepatic steatosis, which is the accumulation of triglycerides (TGs) in the cytoplasm of hepatocytes (4, 5). Although generally asymptomatic, hepatic steatosis or fatty liver is no longer regarded as a neutral and innocent bystander but rather as a pre-morbid condition that increases the vulnerability of this organ to progress to steatohepatitis and to more advanced stages of liver disease (4, 5).

The 5-lipoxygenase (5-LO) pathway, which generates leukotrienes (LTs) from arachidonic acid, is one of the major proinflammatory systems in mammals (6, 7). Inflammatory stimuli elicit a sequence of events, including activation of the enzyme 5-LO and the accessory 5-LO activating protein (FLAP), a fatty acid transport protein that specifically binds and presents arachidonic acid to 5-LO and enhances the sequential oxygenation and dehydration of this FA into the highly unstable allylic epoxide LTA₄. This epoxide is subsequently transformed either to LTB₄ via stereoselective hydration by LTA₄ hydrolase (LTA4H) or to LTC₄ through glutathione conjugation catalyzed by LTC₄ synthase (LTC4S) (6, 7). LTB₄ is among the most potent chemotactic mediators and represents a potential link between innate and adaptive immunological reactions (8). Within the arachidonate 5-LO pathway, the protein FLAP has recently been identified as an emerging target in metabolic disease. In fact, FLAP is over-expressed in the adipose tissue of patients and experimental animals

*Department of Biochemistry and Molecular Genetics and [†]Liver Unit, Hospital Clínic, August Pi i Sunyer Biomedical Research Institute, Esther Koplowitz Biomedical Research Center; and [‡]Biomedical Research Networking Center on Liver and Digestive Diseases, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Received for publication April 29, 2009. Accepted for publication February 1, 2010.

This work was supported by grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF 06/03191 and SAF 09/08767). Centro de Investigación Biomédica en Red en el Área temática de Enfermedades Hepáticas y Digestivas is funded by the Instituto de Salud Carlos III. R.H. is supported by Generalitat de Catalunya-European Social Funds (2006FI-00091). M.L.-P., E.T., and N.F. had contracts with Instituto de Salud Carlos III, Centro de Investigación Biomédica en Red en el Área temática de Enfermedades Hepáticas y Digestivas, and the Ministerio de Ciencia e Innovación (Juan de la Cierva), respectively. A.G.-P., M.M.-C., and E.M.-S. were supported by the Ministerio de Ciencia e Innovación.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Joan Clària, Department of Biochemistry and Molecular Genetics, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, University of Barcelona, Villarroel 170, Barcelona 08036, Spain. E-mail address: jclaria@clinic.ub.es

Abbreviations used in this paper: AA, arachidonic acid; ACC, acetyl-CoA carboxylase; Adip, adiponectin; ALT, alanine aminotransferase; AMPK, AMP-activated protein kinase; AST, aspartate aminotransferase; AUC, area under the curve; BLT1, LTB₄ type 1 receptor; BLT2, LTB₄ type 2 receptor; BODIPY, dipyrromethene boron difluoride; CysLT1, cysteinyl-LT type 1 receptor; CysLT2, cysteinyl-LT type 2 receptor; DPBS, Dulbecco's PBS; EIA, enzyme immunoassay; FASN, fatty acid synthase; FFA, free fatty acid; FLAP, 5-lipoxygenase activating protein; HFD, high-fat diet; HSL, hormone-sensitive lipase; IRS-1, insulin receptor substrate-1; 5-LO, 5-lipoxygenase; LPL, lipoprotein lipase; LT, leukotriene; LTA4H, leukotriene A₄ hydrolase; LTC4S, leukotriene C₄ synthase; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; RP-HPLC, reversed phase-HPLC; SVC, stromal vascular cell; TG, triglyceride; WAT, white adipose tissue.

Copyright © 2010 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/10/\$16.00

with obesity and insulin resistance (8, 9). In addition, 5-LO products have pleiotropic actions on adipose fat accumulation and pancreatic function in mice (10, 11). Moreover, we recently identified a novel steatogenic role for 5-LO in the liver of obese *ob/ob* mice, through mechanisms involving the regulation of hepatic microsomal TG transfer protein activity and very low density lipoprotein-TG and apolipoprotein B secretion (12). However, the potential involvement of the 5-LO pathway in adipose tissue inflammation and adipocyte lipid dysfunction in experimental obesity has not been explored.

In the current investigation, we tested the influence of the 5-LO pathway in adipose tissue inflammation and lipid dysfunction. We first characterized the expression of key enzymes and receptors of this proinflammatory pathway in adipose tissue and isolated adipocytes and stromal vascular cells (SVCs). We also identified the most abundant 5-LO-derived eicosanoids in adipose tissue and explored the effects of these 5-LO products on NF- κ B activity, on the production of inflammatory cytokines and chemokines by adipose tissue explants, and on lipid metabolism in isolated adipocytes. Finally, we assessed the effects of blocking the 5-LO pathway with a selective FLAP inhibitor *in vivo* in a mouse model of dietary obesity. Our findings support the hypothesis that the 5-LO pathway signals the adipose tissue low-grade inflammatory state and its steatogenic potential in experimental obesity.

Materials and Methods

Materials

Murine 3T3-L1 fibroblasts were purchased from the European Collection of Cell Cultures (Salisbury, U.K.). Arachidonic acid, LTB₄, LTD₄, U-75302, MK-571, the primary Ab against hormone-sensitive lipase (HSL), and LTB₄ and cysteinyl-LT EIA kits were purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). TRIZol was obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA), and RNAqueous and DNA-free kits were from Ambion (Austin, TX). Sep Pak Plus C18 cartridges were from Waters Associates (Milford, MA). Primary Abs against AMP-activated protein kinase (AMPK), phospho-AMPK, and phospho-HSL were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). The primary F4/80 Ab was from Serotec (Oxford, U.K.). The ECL Detection System and secondary donkey anti-rabbit HRP Ab were from GE Healthcare (Chalfont St. Giles, U.K.). Bay-X-1005 was kindly provided by Dr. R. Müller-Peddinghaus (Pharma Research Center, Bayer AG, Wuppertal, Germany). Oleic acid [9,10-³H(N)] was from Perkin Elmer (Waltham, MA). All other reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Isolation of adipocytes and SVCs

Adipocytes and SVCs were isolated from epididymal fat pads of C57/BL6 mice. Epididymal tissue was excised, collected in cold carbogen-gassed Krebs-Ringer-bicarbonate buffer at pH 7.4 with 2% BSA, washed, and minced into small fragments. Adipose tissue was then centrifuged at 500 *g* for 5 min to remove erythrocytes and other blood cells. Subsequently, tissue was digested in Krebs-Ringer-bicarbonate buffer with 1 mg/ml collagenase I at 37°C for 40 min with gentle shaking. The suspension was filtered through a 100- μ m nylon mesh and centrifuged at 500 *g* for 5 min. Floating cells (adipocytes) were collected and washed, whereas pelleted cells (SVCs) were incubated with erythrocyte lysis buffer (NH₄Cl, 155 mM; KHCO₃, 10 mM; and EDTA, 0.1 mM) for 5 min and centrifuged. Adipocytes were cultured in carbogen-gassed DMEM with FBS (10%), L-glutamine (2 mM), penicillin (50 U/ml), streptomycin (50 mg/ml), and HEPES (20 mM). Cells were maintained at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere, and the medium was changed every 24 h.

Ex vivo experiments in adipose tissue explants

Adipose tissue explants were obtained from murine epididymal fat pads. Under sterile conditions, samples of adipose tissue were placed in a P60 plate with Dulbecco's PBS (DPBS) containing penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 mg/ml), prewarmed at 37°C. Connective tissue and blood vessels were removed by dissection before cutting the tissue into small pieces (<10 mg). Explants were washed with DPBS at 37°C by centrifugation for 1 min at 400 *g* to remove blood cells and pieces of tissue containing insufficient adipocytes to float. Thereafter, explants were cultured in DMEM with L-glutamine (2 mM), penicillin (50 U/ml), streptomycin (50 mg/ml), and 2% FA-free BSA. To assess FFA secretion, explants were cultured in 12-well plates (40 mg/well) in vehicle (<0.1% DMSO) or isoproterenol (10 μ M), with or without the presence of a 5-LO inhibitor

(1 μ M), for 1 h. FFA levels in supernatants were determined by the NEFA-C Kit (Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan).

Experiments in 3T3-L1 adipocytes

3T3-L1 cells were maintained in DMEM containing 10% bovine calf serum, L-glutamine (4 mM), penicillin (50 U/ml), and streptomycin (50 mg/ml). To differentiate these cells into adipocytes, cells were seeded in 12-well plates (150,000 cells/well) 2 d after reaching confluence. Two days later, the medium was changed to DMEM with 10% FBS, 5 μ g/ml insulin, 0.25 μ g/ml dexamethasone, and 170 μ g/ml isobutylmethylxanthine. After 2 d, cells were maintained in DMEM with 5 μ g/ml insulin for an additional 3 d. Finally, the medium was replaced with DMEM containing only 10% FBS, L-glutamine, and penicillin-streptomycin. At least 90% of the cell population exhibited the adipocyte phenotype with evident accumulation of lipid droplets. Adipocytes were incubated with IL-1 β (10 ng/ml; Peprotech, Rocky Hill, NJ) and vehicle (<0.1% DMSO), the FLAP inhibitor Bay-X-1005 (20 μ M), the LTB₄ receptor antagonist U-75302 (1 μ M), or the cysteinyl-LT receptor antagonist MK-571 (1 μ M) for 24 h at 37°C. RNA was extracted using the RNAqueous kit, and real-time quantitative PCR was performed as described below.

FA uptake

FA uptake by isolated adipocytes was measured using the QBTTM Fatty Acid Uptake Assay Kit (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) according to the manufacturer's instructions. The kit uses a dipyrromethene boron difluoride (BODIPY)-dodecanoic fatty fluorescent analog that remains quenched until it is internalized by the cell. The BODIPY analog is a known substrate for FA transporters because its uptake by adipocytes can be completed by nonlabeled FAs (13, 14). Briefly, 50,000 cells/well were plated in 96-well black fluorescence plates and exposed to vehicle (<0.5% ethanol), LTB₄ (100 nM), or LTD₄ (100 nM) for 30 min at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. In some experiments, cells were pretreated for 10 min with U-75302 (1 μ M) or MK-571 (1 μ M). Following the incubation period, QBT dye was added, and the plate was read in a FluoStar Optima fluorescence plate reader (BMG Labtech, Offenburg, Germany) at 450-nm excitation and 520-nm emission wavelengths every 20 s for 60 min. In addition, FA uptake was determined using a radioactive FA by the rapid filtration method (15, 16). Briefly, 50,000 primary adipocytes were incubated in 1 ml DMEM containing 2% FA-free BSA and different [³H] oleic acid concentrations (oleate/BSA ratios, 0.25:1 and 2:1) for up to 30 min at 37°C. At different time points, FA uptake was stopped by the addition of 5 ml ice-cold stop solution (400 μ M phloretin, 0.1% BSA). Subsequently, cells were filtered, and the radioactivity was counted by a liquid scintillation analyzer. Insulin (160 nM) and BSA-phloretin (200 μ M) were used as positive and negative controls, respectively.

NF- κ B activity

NF- κ B activity was assessed in nuclear extracts from adipose tissue explants cultured in 6-well plates (200 mg/well) in the presence of vehicle (<0.5% ethanol), LTB₄ (1, 10, and 100 nM), or LTD₄ (1, 10, and 100 nM) for 2 h. Nuclear extracts were prepared using the Nuclear Extraction Kit from Millipore (Bedford, MA), following the manufacturer's protocol with slight modifications. Briefly, 200 mg adipose tissue was homogenized in 1 ml cold cytoplasmic lysis buffer in a Dounce homogenizer, and the suspension obtained was filtered through a 250- μ m nylon mesh and centrifuged for 5 min at 250 *g* at 4°C. The pellet obtained was resuspended in ice-cold cytoplasmic lysis buffer and lysed using a small-gauge needle (26 G). Thereafter, lysates were placed on an orbital shaker for 1 h at 4°C and centrifuged at 8,000 *g* for 20 min at 4°C to obtain the nuclei. Nuclear extract proteins were quantified by the MicroBCATM Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL), and NF- κ B activity was determined by the NF- κ B EZ-Transcription Factor Assay (Millipore). A total of 5 μ g nuclear protein/well was assayed, and the binding of NF- κ B transcription factor subunits p50 and p65 was detected in a microplate luminometer (Fluostar Optima).

Cytokine array

Cytokines secreted by adipose tissue were screened using the RayBio Mouse Inflammation Antibody Array 1 (RayBiotech, Norcross, GA), which allows the simultaneous detection of 40 different adipokines, cytokines, and chemokines related to inflammation. Briefly, 200 mg adipose tissue was exposed to vehicle (<0.5% ethanol) or LTB₄ (1 μ M) for 24 h at 37°C in 5% CO₂ atmosphere. In some experiments, cells were pretreated for 10 min with U-75302 (1 μ M). At the end of the incubation period, supernatants were collected, supplemented with protease inhibitors, and frozen at -80°C until analysis. A total of 1 ml supernatant of cultured adipose tissue was added to the Ab-coated membrane and incubated according to

the manufacturer's instructions. The intensity of signals was quantified by densitometry, and the positive control was used to normalize the results from different membranes. Cytokine production in adipose tissue was also assessed in fat explants cultured in 12-well plates (40 mg/well) in the presence of vehicle (<0.5% ethanol), LTB₄ (1, 10, and 100 nM), or LTD₄ (1, 10, and 100 nM) for 24 h. TNF- α , IL-6, and MCP-1 levels in the supernatants were determined by specific enzyme immunoassay (EIA) kits from R&D Systems (Minneapolis, MN). Some experiments were performed in the presence of Bay-X-1005 (30 μ M) for 48 h.

Experimental models of obesity-induced hepatic steatosis

Male C57/BL6 mice were fed a high-fat diet (HFD) (45% kcal from fat, Harland Tekland, Madison, WI) for 16 wk. After 12 wk of feeding, animals were randomly distributed into two groups that received a daily dose of Bay-X-1005 ($n = 10$, 100 mg/kg body weight, by mouth) or placebo ($n = 10$, 0.5% carboxymethylcellulose, by mouth) for 4 wk. At the end of the intervention period, mice were euthanized, blood was collected, and serum obtained by centrifugation at 3000 g for 10 min. Epididymal adipose tissue and liver were excised; rinsed in DPBS; fixed in 10% formalin; and embedded in paraffin or placed in optimal cutting temperature compound, immersed in cold 2-methylbutane on dry ice, and kept at -80°C . In addition, portions of adipose tissue were snap-frozen in liquid nitrogen for further analysis. Samples of adipose tissue, liver, and serum were also collected from groups of C57/BL6 and *ob/ob* (B6.V-Lep^{ob}/J) mice (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) fed on a control diet (11% kcal from fat). All animal studies were conducted in accordance with the criteria of the Investigation and Ethics Committee of the Hospital Clinic (University of Barcelona, Barcelona, Spain) and the European Community laws governing the use of experimental animals.

Glucose and insulin tolerance tests

To perform the glucose tolerance test, overnight-fasted mice received an i.p. injection of 20% glucose (2 g /kg body weight), and blood samples were collected from the tail 0, 15, 22.5, 30, 45, 60, 90, and 120 min later for serum glucose determination using the Accu-Chek Aviva system (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). To perform the insulin tolerance test, mice were fasted for 2 h and then received an i.p. injection of recombinant insulin (0.75 U/kg body weight); blood samples were collected at the time periods described above.

Biochemical analysis

Serum concentrations of glucose, cholesterol, and TG, as well as alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase activities, were determined by standard laboratory procedures. Serum insulin and FFA levels were determined using the Ultrasensitive Mouse Insulin ELISA Kit (Merckodia, Uppsala, Sweden) and the NEFA C Kit, respectively.

Analysis of hepatic lipid content by Oil Red O staining

Optimal cutting temperature-embedded liver samples were cut into 5- μ m sections and stained with Oil Red O to evaluate the hepatic lipid content, as previously described (12, 17). Briefly, cryosections were fixed in 60% isopropanol for 10 min and stained with 0.3% Oil Red O in 60% isopropanol for 30 min and subsequently washed with 60% isopropanol. Sections were counterstained with Gill's hematoxylin, washed with acetic acid solution (4%), and mounted with aqueous solution. Sections were visualized under a Nikon Eclipse E600 microscope (Kawasaki, Japan) at magnification $\times 200$, and relative areas of steatosis (expressed as percent of area stained with Oil Red O) were quantified by histomorphometry using a computerized image analysis system (AnalySIS, Soft Imaging System, Munster, Germany). At minimum, 18 independent fields per sample were evaluated.

Detection of F4/80 by immunohistochemistry

F4/80 detection was performed as described previously (18), with slight modifications. Briefly, adipose tissue paraffin sections were deparaffinized, rehydrated, and pretreated with trypsin 0.05%-CaCl₂ 0.1% for 20 min at 37°C to unmask the Ag, followed by incubation with H₂O₂ 0.3% for 25 min at room temperature and dark conditions to block endogenous peroxidase activity and with BSA 2% for 20 min at room temperature to avoid unspecific binding of the primary Ab. Sections were then incubated overnight at 4°C with the primary rat anti-mouse F4/80 Ab (1/250), followed by incubation for 30 min at room temperature with a biotinylated rabbit anti-rat IgG secondary Ab (1/200) and incubation with ABC for 30 min at room temperature using Vectastain ABC Kit (Vector, Burlingame, CA). Color was developed using the diaminobenzidine substrate (Roche Diagnostics), and sections were counterstained with hematoxylin. Sections were visualized at magnification $\times 200$,

and the results expressed as the percent of F4/80-expressing cells. At minimum, 18 independent fields per sample were evaluated.

Analysis of eicosanoids by EIA and reversed phase-HPLC

LTB₄ and Cys-LT levels were determined in samples of adipose tissue of ~ 0.2 – 0.4 g obtained from wild-type and *ob/ob* mice. Each sample was individually homogenized with an Ultra-Turrax T25 (Ika, Werke Staufen, Germany) in 5 ml cold MeOH-H₂O (65/35, v/v) and extracted with Sep Pak C₁₈ columns, prior to EIA analysis. 5-LO products were also determined by reversed phase (RP)-HPLC analysis. Briefly, adipose tissue explants from *ob/ob* mice were incubated with 5 ml Ringer buffer containing arachidonic acid (50 μ M) and ionophore A23187 (5 μ M) for 90 min at 37°C. An internal standard, PGB₂, was added to the samples, and the tissue was extracted as explained above. The final eluate was collected, dried under a stream of N₂, and dissolved in solvent A (methanol/H₂O/acetic acid; 65:35:0.01, v/v/v, pH 5.7). Reversed phase-HPLC (RP-HPLC) analysis was performed with a C₁₈ column (Spherisorb ODS, 5 μ m, 4.6 \times 250 mm; Supelco, Bellefonte, PA). After sample loading, the column was developed with a solvent gradient consisting of 36 min of solvent A, 1 min of gradient to 45% (v/v) solvent B (methanol/acetic acid; 100:0.01, v/v), and 22 min of 45% (v/v) solvent B at a flow rate of 1.2 ml/min. The eluate from the column was monitored by UV absorption at 234 and 270 nm, and identification of the compounds was performed by comparing peak retention times with that of the standards.

Gene expression profiling

Total RNA was isolated using the TRIzol reagent. RNA concentration was assessed in a UV spectrophotometer, and its integrity was tested in a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Samples were treated with DNase (DNA-free) and retrotranscribed with the High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). PCR amplification of 5-LO, FLAP, LTC4S, LTA4H, 12/15-LO, LTB₄ type 1 (BLT1) and type 2 (BLT2) receptors, and cysteinyl-LT type 1 (CysLT1) and type 2 (CysLT2) receptors was performed with specific oligonucleotides (Table I) (19, 20). The specificity of primers was confirmed in the GenBank database, using the basic local alignment search tool, and by direct sequencing of the amplified PCR products in an ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer using a Big Dye Terminator (version 3.1) Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). PCR products were analyzed by electrophoresis in 1.5% agarose gels and visualized by ethidium bromide staining, using a 100-bp DNA ladder (Invitrogen) as an m.w. marker.

Quantitative analysis of gene expression was performed by real-time PCR in an ABI Prism 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Ready-to-use primer and probe sets (TaqMan Gene Expression Assays; Applied Biosystems) were used to quantify acetyl-CoA carboxylase (ACC) (ID: Mm01304285_m1), adiponectin (ID: Mm00456425_m1), fatty acid synthase (FASN) (ID: Mm00662319_m1), FLAP (ID: Mm00802100_m1), LTC4S (Mm00521864_m1), GLUT-4 (ID: Mm00436615), IL-6 (ID: Mm004461-90_m1), insulin receptor substrate-1 (IRS-1) (ID: Mm01278327_m1), lipoprotein lipase (LPL) (ID: Mm00434764_m1), MCP-1 (ID: Mm0044124-2_m1), peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α (ID: Mm0044-0939_m1), PPAR γ (ID: Mm00440945_m1), resistin (ID: Mm00445641_m1), and TNF- α (ID: Mm00443258_m1) gene expression, using β -actin (ID: Mm00607939_s1) as an endogenous control. PCR results were analyzed with Sequence Detector Software (version 2.1; Applied Biosystems). The amount of target gene, normalized to β -actin and relative to a calibrator, was determined by the arithmetic Equation $2^{-\Delta\Delta Ct}$ described in the comparative C_t method.

AMPK and HSL phosphorylation

Total proteins from adipose tissue and adipocytes were extracted in homogenizing buffer containing 50 mM HEPES, 20 mM β -glycerol, 2 mM EDTA, 1% Igepal, 10% glycerol, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 150 mM NaCl, 10 mM NaF, 20 mM sodium pyrophosphate decahydrate, 2 mM sodium orthovanadate, and protease inhibitors. Homogenates were incubated on ice for 15 min with frequent vortexing. Thereafter, homogenates were centrifuged at 16,100 g for 20 min at 4°C, and supernatants were collected. AMPK, phospho(Thr-172)-AMPK, HSL, and phospho(Ser-563)-HSL protein expression was analyzed by Western blot. A total of 80 μ g adipose tissue protein (determined by the Micro BCA Protein Assay Kit; Pierce) was resuspended in SDS-containing Laemmli sample buffer, heated for 5 min at 95°C, and separated by SDS-PAGE (12% and 10% for AMPK and HSL, respectively). Proteins were electroblotted for 120 min at 100 V at 4°C onto polyvinylidene difluoride membranes, and the efficiency of the transfer was visualized by Ponceau S solution staining. Membranes were then soaked for 1 h at room temperature in TBS (TBS, 20 mM Tris/HCl pH 7.4 and 0.5 M NaCl) containing 0.1% (v/v) Tween 20 (0.1% T-TBS) and 5% (w/v) nonfat

dry milk. Blots were washed three times for 5 min each with 0.1% T-TBS and subsequently treated overnight at 4°C with primary rabbit anti-mouse Abs against phospho-AMPK or phospho-HSL (dilution 1:1,000) in 0.1% T-TBS containing 5% BSA. After washing the blots three times for 5 min each with 0.1% T-TBS, membranes were incubated for 1 h at room temperature with an HRP-linked donkey anti-rabbit Ab (1:2,000) in 0.1% T-TBS, and bands were visualized using an ECL Detection System. Total AMPK and HSL proteins were detected after blot stripping. Briefly, membranes were incubated 20 min at 50°C with Tris/HCl, pH 6.7; 100 mM β -mercaptoethanol; and 2% SDS. After washing, membranes were treated overnight at 4°C with rabbit anti-mouse Abs against AMPK or HSL (1:1,000) in 0.1% T-TBS containing 5% nonfat dry milk.

Statistical analysis of the results was performed by one-way or two-way ANOVA and by unpaired Student *t* test. Results are expressed as mean \pm SEM, and differences were considered significant at *p* < 0.05.

Results

In a first series of experiments, we examined the expression of key components of the 5-LO pathway in adipose tissue by PCR (Table I). As shown in Fig. 1A, whole adipose tissue from lean wild-type mice expressed all enzymes necessary for LT biosynthesis (5-LO, FLAP, LTA4H, and LTC4S), as well as all four LT receptors (BLT1, BLT2, CysLT1, and CysLT2). Adipose tissue also expressed 12/15-LO (Fig. 1A). Separation of the adipose tissue into the adipocyte and SVC fractions demonstrated that both fractions expressed the enzymes and receptors involved in the 5-LO pathway (Fig. 1B, lanes 2 and 3). To examine whether the 5-LO pathway is modulated by obesity, we analyzed gene expression in whole adipose tissue from obese mice. As shown in Fig. 1C, FLAP mRNA levels were significantly increased in adipose tissue from *ob/ob* mice, compared with that from lean wild-type mice. Consistent with the presence of this FLAP overexpression, adipose tissue from obese mice had increased levels of the proinflammatory 5-LO product LTB₄, without changes in Cys-LT levels (Fig. 1D). These differences were more evident following the incubation of adipose tissue samples with exogenous arachidonic acid (50 μ M) and stimulated with calcium ionophore (5 μ M) (data not shown). To profile the eicosanoids from the 5-LO pathway produced by obese adipose tissue, we performed RP-HPLC analysis. As shown in Fig. 1E, products coeluting with synthetic LTB₄ were detected after the incubation of adipose tissue with arachidonic acid (Fig. 1E, lower panel). LTD₄ was not detected in these incubations, although a small peak coeluted with synthetic LTC₄ (Fig. 1E, lower panel). The addition of exogenous arachidonic acid was needed because the pico-

gram amounts of endogenous 5-LO products isolated from adipose tissue precluded their direct detection by RP-HPLC (Fig. 1E, middle panel). Together, these findings indicate the presence of increased FLAP expression and LTB₄ levels in adipose tissue from obese mice.

Because the presence of low-grade inflammation is linked to the transcriptional activation of NF- κ B, we next examined the effects of the most representative 5-LO products on NF- κ B activity. As shown in Fig. 2A, nanomolar concentrations of LTB₄ were able to induce, in a concentration-dependent manner, NF- κ B activity in adipose tissue, as revealed by a significant increase in the nuclear translocation of the p65 subunit. LTD₄ was also able to induce NF- κ B activity in the adipose tissue, but to a lower extent (Fig. 2A). Similar results were obtained with the nuclear translocation of the NF- κ B p50 subunit (data not shown). Given that activation of NF- κ B stimulates the production of proinflammatory cytokines, we next assessed by EIA the effects of LTB₄ and LTD₄ on the production of MCP-1, IL-6, and TNF- α by adipose tissue. As shown in Fig. 2B, the addition of LTB₄, especially at 10-nM concentration, induced the production of these adipokines characteristic of inflamed adipose tissue, an effect that was not reproduced by the addition of LTD₄ to the explants. Because LTB₄ influences the secretion of adipokines by adipose tissue, we analyzed the profile of adipokines secreted by this tissue either under baseline conditions or following the addition of this 5-LO product. Under baseline conditions, among the 40 cytokines tested in a cytokine protein array, 24 were secreted into the medium by adipose tissue (Fig. 2C). The most abundant adipokines secreted by resting adipose tissue were MCP-1, MIP-1 γ , and IL-6 (Fig. 2C). Remarkably, following prolonged incubation (24 h) with LTB₄ there was a significant induction of cytokine and chemokine release by adipose tissue (Fig. 2D). For instance, LTB₄ induced a 3- and 6-fold increase in IL-6 and MCP-1 secretion, respectively (Fig. 2D). In addition, LTB₄ induced the release of eotaxin-2, TNFRSF8L, and IL-4, which were not detected under resting conditions (Fig. 2D). These changes in adipokine secretion appeared to be LTB₄ specific because they were prevented by the addition of the BLT1 receptor antagonist U-75302 (Fig. 2D). Interestingly, the results of the cytokine array were consistent with those obtained by EIA.

Given that the state of low-grade inflammation influences lipid metabolism in the adipocyte, in the next series of experiments we examined the role of the 5-LO pathway in FFA uptake and release by adipocytes and adipose tissue explants. For this purpose, primary

Table I. PCR primer sequences, product sizes, and gene identification numbers

Gene	GenBank Accession No.		Primer Sequence	Expected Product Size (bp)
5-LO ^a	NM_009662	F	5'-CCCCGAAGCTCCCAGTGACC-3'	492
		R	5'-TCCCGGGCCTTAGTGTGATA-3'	
FLAP ^a	NM_009663	F	5'-GGACCGGGACTCTTGCCCTTGA-3'	339
		R	5'-GCGGGGAGATCGTCGTGCTTAC-3'	
LTC4S ^a	NM_008521	F	5'-GCTGGCAATATGAAGGACGAAGTG-3'	141
		R	5'-TCGCTCGCCGGACGCTGAC-3'	
LTA4H ^a	NM_008517	F	5'-GTGGCGAGGAACACAGCGAAAGTA-3'	330
		R	5'-CGATGGCCTGGCACTGACTGAAGA-3'	
12/15-LO ^a	NM_007440	F	5'-CCCACCGCCGATTTTCCACG-3'	333
		R	5'-AGTCCT CGCTCAGCCAATCATCA-3'	
BLT1	NM_008519	F	5'-GCCGCCTGTGCCACTATGTCT-3'	353
		R	5'-CAGCCTGCGCCCGATGTC-3'	
BLT2	NM_020490	F	5'-CGGGGCGACAAGGCACAC-3'	252
		R	5'-CCCGCGGCAGCAATCC-3'	
CysLT1	NM_021476	F	5'-AGAACAGTGGCCACAGTAAGAAGG-3'	302
		R	5'-TGCCAAAGAAACCCACAACAGA-3'	
CysLT2 ^b	NM_133720	F	5'-AGGGCGACCGAAGGCAGAGGCAC-3'	270
		R	5'-GCCATTATATGTCTTTGGAGTTCAAACCATTC-3'	

^aPreviously reported in Horrillo et al. (19).

^bPreviously reported in Hui et al. (20).

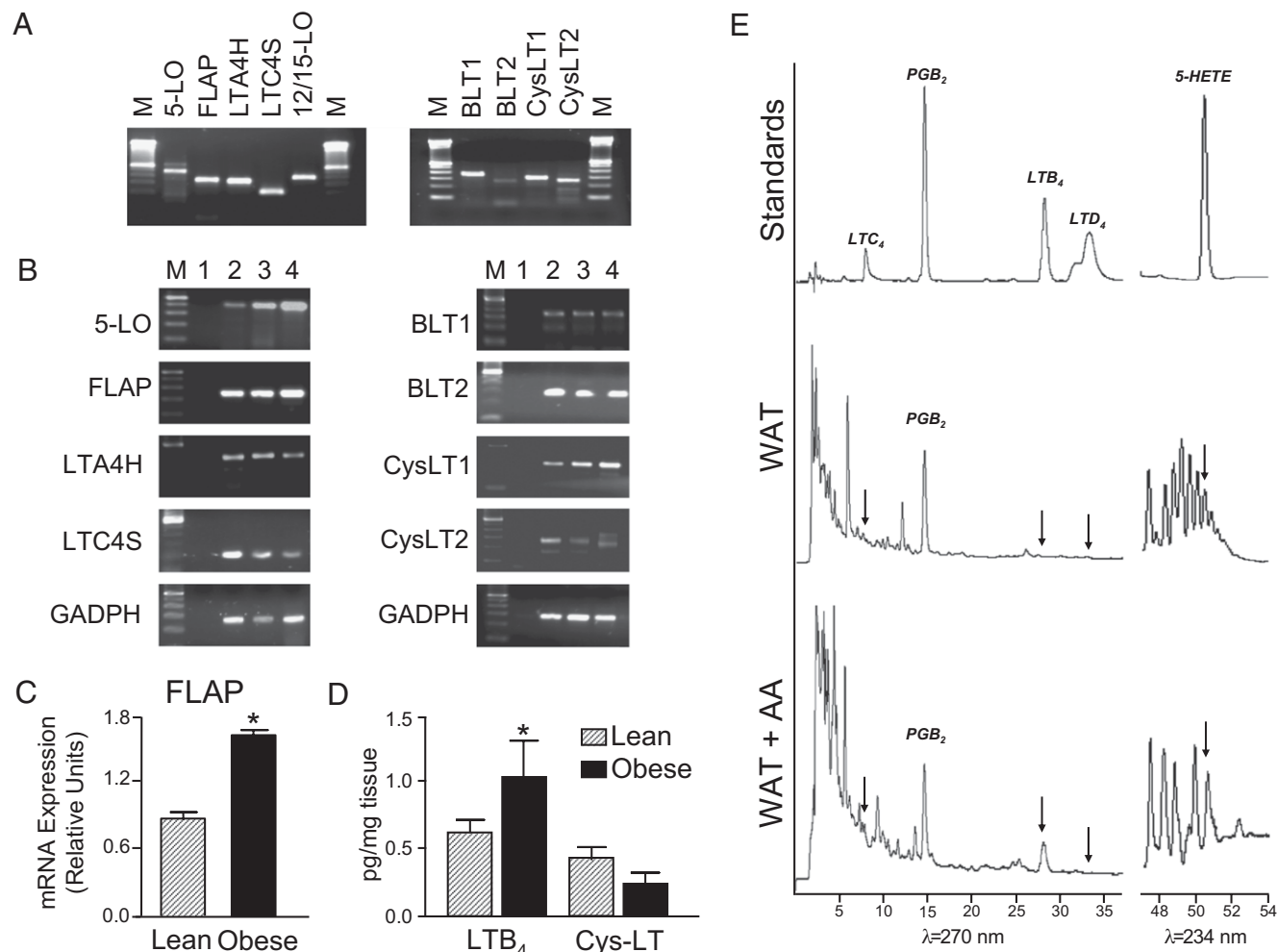


FIGURE 1. Characterization of key components of the 5-LO pathway in adipose tissue. *A*, Representative PCR analysis of mRNA expression for 5-LO, FLAP, LTC₄S, LTA₄H, and 12/15-LO, as well as the two LTB₄ (BLT1 and BLT2) and the two cys-LT (CysLT1 and CysLT2) receptors in adipose tissue from lean wild-type mice. A 100-bp DNA ladder was used as a size standard (M). *B*, Representative PCR analysis of 5-LO, FLAP, LTC₄S, LTA₄H, BLT1, BLT2, CysLT1, CysLT2, and GADPH mRNA expression in adipocytes (*lane 2*) and SVCs (*lane 3*) from lean wild-type mice. *Lanes 1* (water) and *4* (Raw 264.7) were used as negative and positive controls, respectively. *C*, FLAP expression in adipose tissue samples from wild-type (lean, *n* = 5) and *ob/ob* (obese, *n* = 5) mice was assessed by real-time PCR and normalized to β -actin levels. *D*, LTB₄ and cys-LT levels in whole adipose tissue samples from lean and obese mice were assessed by EIA after solid extraction with Sep-Pak C₁₈ columns. Results are expressed as mean \pm SEM. **p* < 0.05 versus wild-type (*C*, *D*). *E*, Representative RP-HPLC chromatograms of 5-LO products in WAT from obese mice. Materials were extracted with Sep-Pak C₁₈ cartridges and injected into an RP-HPLC system, as described in *Materials and Methods*. The *upper panel* shows a representative profile of synthetic standards. The *middle panel* shows a representative profile of materials from unstimulated WAT explants. The *lower panel* shows a representative profile of materials from WAT explants incubated with arachidonic acid (50 μ M) and A23187 (5 μ M) for 90 min at 37°C. PGB₂ (50 ng) was added as an internal standard. Arrows indicate the retention times of appropriate standards. AA, arachidonic acid.

adipocytes were incubated with nanomolar concentrations of 5-LO products and subsequently exposed to a BODIPY-labeled fluorescent FA, and the uptake was monitored in the assay. As shown in Fig. 3A, FFA uptake by adipocytes was significantly decreased by LTB₄. Furthermore, the effects of LTB₄ on the uptake of FFAs were partially prevented by the addition of the BLT1 receptor antagonist U-75302 (Fig. 3A). In contrast, FA uptake by adipocytes was not significantly modified by LTD₄ and its selective receptor antagonist MK-571 (Fig. 3A). The results obtained in the BODIPY-labeled fluorescent FA uptake assay were validated using radioactive-labeled oleic acid. As shown in Fig. 3B, addition of LTB₄ to primary adipocytes significantly reduced [³H] oleic acid uptake in a time-dependent manner. Interestingly, the inhibitory effect of this 5-LO product was more prominent at 30 s of incubation when the uptake of radioactive-labeled FA was maximal. The uptake of [³H] oleic acid was also concentration dependent and reached a maximum when the oleate/albumin molar ratio was 2:1 (data not shown). Consistent with

the effects of LTB₄ on lipid transport, 5-LO inhibition was able to abrogate the lipolysis induced by the β -adrenergic agonist isoproterenol in adipose tissue explants (Fig. 3C). In these experiments, 5-LO inhibition induced a 65% reduction in the levels of LTB₄ in the adipose tissue explants (Fig. 3C, *inset*). Together, these results support the notion that in addition to the inflammatory response, the 5-LO pathway is also involved in the dysregulation of lipid metabolism in adipose tissue.

To investigate the relevance of these *in vitro* findings *in vivo*, we next assessed the effects of blocking the 5-LO pathway with a selective and potent FLAP inhibitor in a mouse model of dietary obesity. At 12 wk under an HFD (45% kcal from fat), and in comparison with a group receiving a control diet (11% kcal from fat), mice showed increased adiposity characterized by statistically significant differences in terms of body weight, white adipose tissue (WAT) weight, serum glucose and insulin levels, and glucose tolerance (Fig. 4A). In this dietary model of obesity, we observed elevated FLAP expression

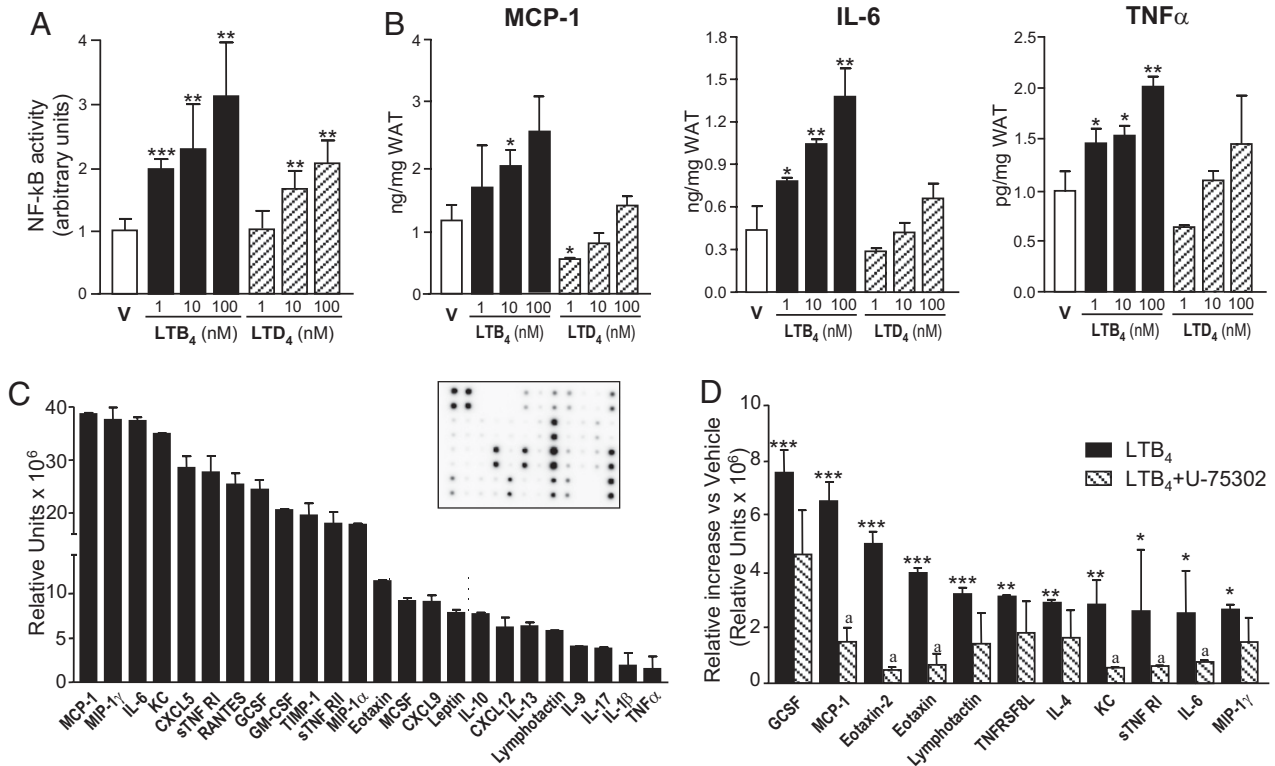


FIGURE 2. 5-LO-derived products induce adipose tissue inflammation. *A*, Increase in NF- κ B activity. Adipose tissue explants from lean wild-type mice were incubated in the presence of vehicle (0.5% ethanol), LTB₄ (1, 10, and 100 nM), or LTD₄ (1, 10, and 100 nM) for 2 h. Nuclear extraction and NF- κ B activity assay were performed as described in *Materials and Methods*. **p* < 0.05; ****p* < 0.01; *****p* < 0.001 with respect to vehicle. *B*, Increase in the secretion of proinflammatory cytokines. Adipose tissue explants from lean wild-type mice were incubated in the presence of vehicle (0.5% ethanol), LTB₄ (1, 10, and 100 nM), or LTD₄ (1, 10, and 100 nM) for 24 h. The production of MCP-1, IL-6, and TNF- α was determined in the supernatants by specific EIAs. Results are expressed as the mean \pm SEM of three different experiments performed in duplicate. **p* < 0.05; ***p* < 0.01 with respect to vehicle. *C*, Profile of cytokines secreted by adipose tissue. Explants of adipose tissue were incubated for 24 h in DMEM and cytokines secreted into the conditioned medium were assessed in a membrane-based Ab array kit. *Inset*, A representative image of the profile of cytokines secreted from adipose tissue. *D*, LTB₄ increases cytokine secretion. Adipose tissue explants from wild-type mice were incubated for 24 h in the presence of vehicle (0.5% ethanol) or LTB₄ (1 μ M). Adipose tissue samples were also pretreated for 10 min with U-75302 (1 μ M) before adding LTB₄ (1 μ M). The amount of cytokines secreted was assessed as described in *C*. **p* < 0.05; ***p* < 0.01; *****p* < 0.001 with respect to vehicle; a, *p* < 0.01 with respect to LTB₄ treatment.

in adipose tissue, which was paralleled with more F4/80-positive cells, indicative of more macrophages in the adipose tissue, and an increased area stained with Oil Red O in the liver, indicative of accelerated hepatic steatosis (Fig. 4*B*). The expression of LTC4S was also found to be increased in adipose tissue from HFD-fed mice (data not shown). Most importantly, the administration of the FLAP inhibitor Bay-X-1005 to these mice exerted a remarkable protective effect, inducing a significant reduction in F4/80 immunostaining in adipose tissue as well as a significant reduction of the area stained with Oil Red O in the liver (Fig. 5*A*). As shown in Fig. 5*B*, inhibition of the 5-LO pathway with the selective FLAP inhibitor Bay-X-1005 achieved a 60% reduction in the formation of 5-LO products (LTB₄ and Cys-LTs) in the adipose tissue of obese mice. Furthermore, the anti-inflammatory and antisteatotic effects exerted by FLAP inhibition were associated with markedly lower circulating levels of FFAs and insulin and with an improvement in insulin sensitivity (Fig. 5*B*). No changes in body, liver, and adipose tissue weight or serum biochemistry values were observed in mice receiving Bay-X-1005, compared with those receiving placebo (Table II).

To understand the molecular mechanisms underlying the protective effects exerted by the FLAP inhibitor Bay-X-1005, we assessed changes in the activity of AMPK, a key fuel-sensing enzyme that responds to changes in cellular energy state. As shown in Fig. 6*A* (upper panel), Western blot analysis revealed that AMPK phosphorylation was significantly increased in adipose tissue from mice treated with Bay-X-1005. Consistent with this finding, the addition of LTB₄ to

isolated adipocytes resulted in a reduction in AMPK phosphorylation (Fig. 6*A*, middle panel). In addition, Western blot analysis also showed that the activity of HSL, the enzyme responsible for the secretion of FFAs from adipocytes, was markedly decreased in adipose tissue from mice treated with Bay-X-1005 (Fig. 6*A*, lower panel). Analysis by quantitative real-time PCR of a selection of relevant genes in glucose/lipid metabolism revealed significant downregulation of adipokines under the control of AMPK activity such as TNF- α and IL-6 (Fig. 6*B*). This finding was further confirmed by measuring the levels of these two cytokines in the medium, using EIA (Fig. 6*C*). Consistent with these findings, TNF- α and IL-6 were downregulated by incubation of 3T3-L1 adipocytes, either with Bay-X-1005 or with the selective BLT1 receptor antagonist U-75302 (Fig. 6*D*). Incubation of 3T3-L1 adipocytes with the selective CysLT1 receptor antagonist MK-571 also decreased TNF- α and IL-6 expression (from 1.05 to 0.15 and from 1.15 to 0.10, respectively). In contrast, PPAR α , which is a nuclear receptor regulating FA metabolism, was significantly upregulated in adipose tissue samples from mice receiving Bay-X-1005 (Fig. 6*E*). No changes in MCP-1, adiponectin, resistin, PPAR γ , LPL, ACC, FASN, IRS-1, or GLUT-4 were observed (Fig. 6*B*, 6*D*, 6*E*).

Discussion

The current study provides evidence for the expression of the 5-LO pathway in adipose tissue and outlines a previously unrecognized role for this pathway in mediating the obesity-associated low-grade

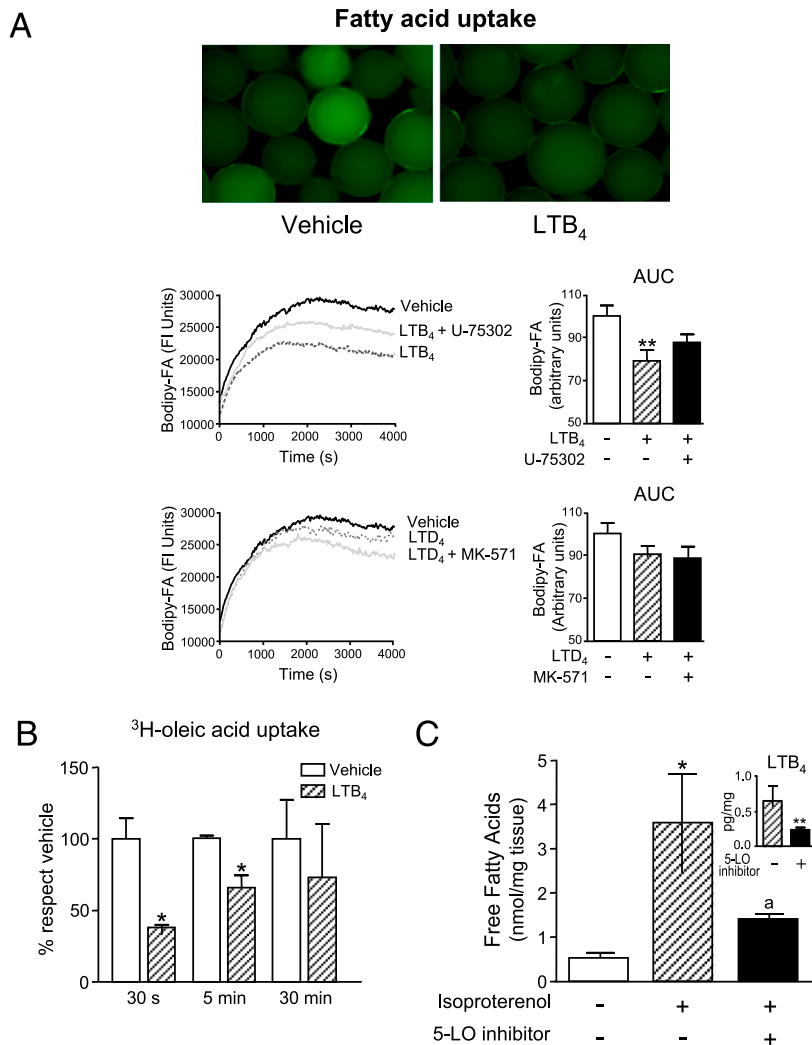


FIGURE 3. 5-LO-derived products modulate FA metabolism in adipose tissue. Effects of LTB₄ and LTD₄ on adipocyte FA uptake. **A**, Isolated adipocytes were exposed to vehicle (<0.5% ethanol), LTB₄ (0.1 μM), or LTD₄ (0.1 μM) for 30 min at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere (original magnification ×400). Adipocytes were also pretreated for 10 min with U-75302 (1 μM) or MK-571 (1 μM) before the addition of LTs. Fluorescent signals from the BODIPY-FA were collected every 20 s for 60 min. Representative photomicrographs and typical time-course curves are shown. The results obtained from the calculation of the area under the curve are expressed as mean ± SEM of four different experiments performed in triplicate. **B**, Isolated adipocytes were exposed to vehicle (<0.5% ethanol) or LTB₄ (0.1 μM) for 30 min and then incubated in medium containing 577 μM of oleic acid with 5 μCi of [³H]oleate/ml (FA/BSA ratio, 2:1) at 37°C at increasing periods of time. Results are presented as percentage of radioactivity, compared with vehicle. **C**, 5-LO inhibition abrogates adipose tissue lipolysis. Adipose tissue explants were incubated for 1 h with isoproterenol (10 μM), with or without the presence of a 5-LO inhibitor. At the end of the incubation period, the concentration of FFAs in the medium was measured by an enzymatic kit. *Inset*, LTB₄ levels in supernatants of adipose tissue explants incubated for 1 h, with or without the presence of the 5-LO inhibitor. Treatments were performed in duplicate, and results are expressed as the mean ± SEM. **p* < 0.05; ***p* < 0.01 versus vehicle; a, *p* < 0.05 versus isoproterenol treatment. AUC, area under the curve.

inflammatory state in adipose tissue and adipocyte dysfunction. Our findings demonstrate that lipid mediators derived from the 5-LO pathway regulate inflammation (i.e., NF-κB activity and the secretion of the proinflammatory adipokines MCP-1, IL-6, and TNF-α) in adipose tissue, as well as directly control FA metabolism in adipocytes. At the in vivo level, we demonstrate that pharmacological inhibition of the 5-LO pathway by means of a selective FLAP inhibitor in a mouse model of dietary obesity results in decreased macrophage infiltration in the adipose tissue, in addition to reduced circulating levels of FFAs, which are essential for the progression of obesity-associated complications such as insulin resistance and hepatic steatosis. Beneficial responses to inhibition of the 5-LO pathway appear to be mediated by induction of AMPK activity in adipose tissue, with concomitant regulation of HSL activity and TNF-α and IL-6 secretion, direct targets of AMPK in this organ. To our knowledge, this is the first study reporting the impact of 5-LO-derived lipid mediators on adipose tissue inflammation and lipid dysfunction.

Our study provides evidence that the 5-LO pathway is involved in adiposity, namely, regulation of the inflammatory process and lipid dysfunction in adipose tissue. Indeed, we provide data demonstrating that 5-LO products significantly enhanced nuclear translocation of p50 and p65 subunits and therefore induced NF-κB activity in adipose tissue. Although activation of this nuclear receptor by LTs has been reported in monocytes and vascular smooth muscle cells (21, 22), we believe this is the first time that an NF-κB-dependent signaling pathway has been demonstrated for 5-LO products in adipose tissue.

Transcriptional activation of NF-κB induces low-grade inflammation and stimulates production of proinflammatory molecules, leading to insulin resistance and hepatic steatosis (23, 24). In our study, we also detected an induction of the secretion of several cytokines and chemokines to the medium in adipose tissue explants in which NF-κB activity was increased by 5-LO products. Among these molecules, we detected adipokines directly involved in the pathogenesis of the metabolic syndrome, such as MCP-1, IL-6, and TNF-α, which connect adipose tissue inflammation with insulin resistance and hepatic steatosis (25). Our findings also provide evidence that the 5-LO pathway, in addition to contributing to mounting inflammation in adipose tissue, contributes to regulating the flux of FFAs from adipose tissue. According to the conventional explanation, increased adipocyte mass and increased lipolysis (i.e., hydrolysis of TGs) contribute to elevated circulating levels of FFAs, which play a critical role in obesity-associated insulin resistance and hepatic steatosis through increased HSL activity (26). In our study, LTB₄, but not LTD₄, reduced the uptake of FFAs by adipocytes, whereas inhibition of the 5-LO pathway decreased HSL activity and the lipolytic rate of adipose tissue. Similar effects on lipolytic activity and HSL phosphorylation were previously reported by Gowri et al. (27), using masoprocol, a nonselective LO inhibitor. The physiological consequences of these changes in adipose tissue function were corroborated in vivo by the observation that inhibition of the 5-LO pathway reduced circulating FFA concentrations and alleviated insulin resistance and hepatic steatosis in

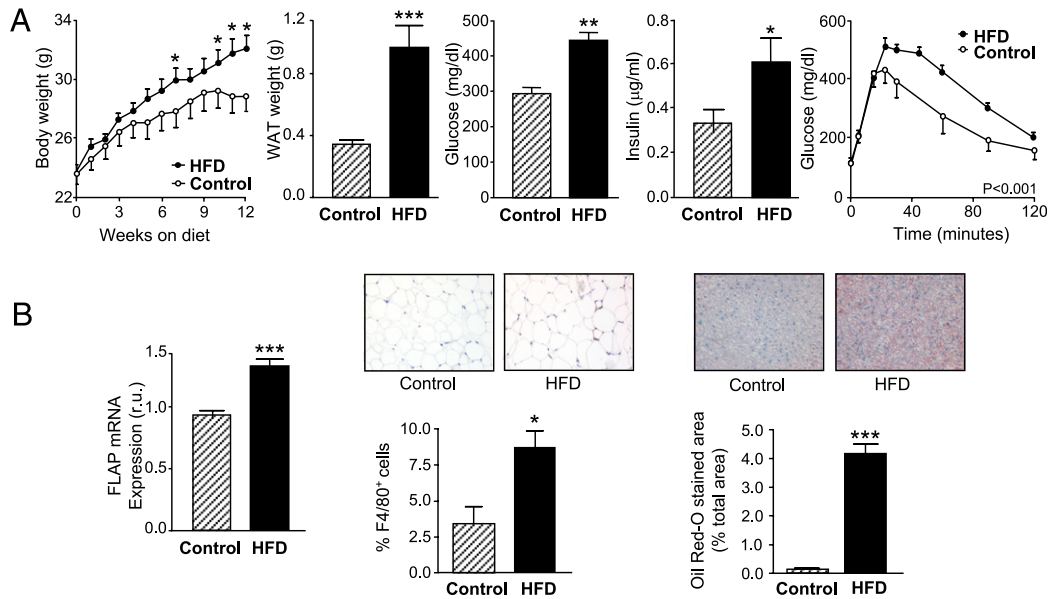


FIGURE 4. Increased adiposity, altered insulin sensitivity, increased FLAP expression, and inflammation in adipose tissue and augmented hepatic steatosis in mice with dietary obesity. *A*, Body and epididymal WAT weight, serum glucose and insulin levels, and glucose tolerance tests in mice fed with either an HFD (45% kcal from fat, $n = 10$) or a control diet ($n = 8$) for 12 wk. *B*, FLAP expression in adipose tissue and histomorphometrical analysis of adipose tissue sections stained with F4/80 (original magnification $\times 200$) and liver sections stained with Oil Red O (original magnification $\times 200$) from mice fed an HFD or a control diet. Results are the mean \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ versus mice receiving a control diet.

mice with dietary obesity. These findings are consistent with the antisteatotic effects exerted by a 5-LO inhibitor in a murine model of obesity-induced hepatic steatosis (12).

The results of the current study also provide a mechanism by which the 5-LO pathway may exert regulatory effects on adipose tissue function. According to our data, involvement of the 5-LO pathway in adipose tissue inflammation and lipid dysfunction is linked to the activation of AMPK, which is a key regulatory component of energy homeostasis in various cell types, including adipocytes (28, 29). AMPK responds to changes in the cellular energy state; thus, when the AMP/ATP ratio is increased, this enzyme is phosphorylated and becomes active to restore energy levels by inhibiting ATP-consuming

pathways and activating ATP-producing pathways (28, 29). In our experiments, inhibition of the 5-LO pathway with a FLAP inhibitor resulted in an induction of AMPK phosphorylation in adipose tissue. Conversely, the 5-LO product LTB₄ reduced AMPK phosphorylation in adipocytes. The mechanisms underlying this finding are not fully delineated, but our results are consistent with previous reports demonstrating the inhibition of AMP production by LTB₄ (30, 31). In addition, the AMPK pathway has profound effects on the regulation of lipid metabolism. In our study, AMPK activation induced by FLAP inhibition was accompanied by a decrease in the activity of HSL, which controls the release of FFAs from adipose tissue (28, 29). Furthermore, FLAP inhibition downregulated the

FIGURE 5. Protective effects of FLAP inhibition in mice with dietary obesity. *A*, Histomorphometrical analysis of adipose tissue sections stained with F4/80 and liver sections stained with Oil Red O from mice with diet-induced obesity treated with placebo ($n = 10$) or with the FLAP inhibitor Bay-X-1005 (100 mg/kg body weight) ($n = 10$) for 4 wk (original magnification $\times 200$). *B*, Effects of Bay-X-1005 on 5-LO production, serum FFA, and insulin levels and insulin sensitivity in mice with HFD-induced obesity. Levels of 5-LO products in adipose tissue samples were assessed by EIA after solid extraction with Sep-Pak C₁₈ columns. Insulin tolerance tests were assessed by calculating the area under the curve after insulin injection. Results are expressed as the mean \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$ versus mice treated with placebo. AUC, area under the curve.

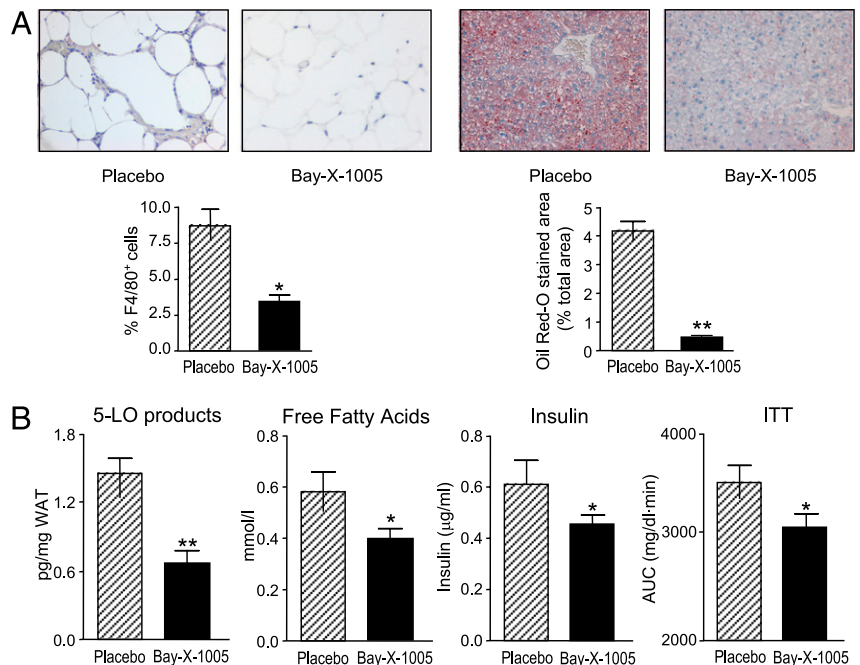


Table II. *Body, liver, and epididymal fat weight and serum biochemistry values in HFD-fed mice receiving either placebo or Bay-X-1005*

Parameter	Placebo (n = 10)	Bay-X-1005 (n = 10)
Body weight (g)	28.9 ± 1.3	28.9 ± 0.5
Epididymal fat weight (g)	1.02 ± 0.15	0.79 ± 0.08
Epididymal fat/body weight ratio (%)	3.40 ± 0.36	2.92 ± 0.27
Liver weight (g)	1.05 ± 0.03	1.00 ± 0.04
Liver/body weight ratio (%)	3.67 ± 0.09	3.75 ± 0.14
Serum glucose (mg/dl)	443 ± 22	408 ± 44
Serum TG (mg/dl)	43.2 ± 6.2	42.0 ± 4.9
Serum cholesterol (mg/dl)	109.5 ± 4.0	121.4 ± 5.9
Serum AST (U/l)	145 ± 21	145 ± 33
Serum ALT (U/l)	28.1 ± 2.3	23.6 ± 1.9

Data are expressed as mean ± SEM.

ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase.

expression and diminished the secretion of IL-6 and TNF- α , two adipokines involved in insulin resistance and hepatic steatosis and directly modulated by AMPK (32). Similar reductions of IL-6 and TNF- α release have been demonstrated during the incubation of adipose tissue explants with AICAR, a synthetic AMPK activator (32).

The 5-LO pathway catalyzes the oxygenation of arachidonic acid into a series of proinflammatory lipid mediators called LTs (6, 7). In this study, we detected constitutive expression of all the enzymes implicated in the formation of LTB₄, cys-LTs, and 5-hydroxyeicosatetraenoic acid in adipose tissue, as well as in the adipocyte and SVC fractions isolated from this tissue. Moreover, in these samples we

detected expression of the two receptors recognizing LTB₄ (i.e., BLT1 and BLT2) and the two receptors recognizing cys-LTs (i.e., CysLT1 and CysLT2). Consistent with previous studies showing the presence of FLAP and 5-LO protein expression in adipocytes and the induction of their expression in obese adipose tissue (8, 9), we report in this paper that FLAP expression and LTB₄ levels increase with obesity, suggesting a potential novel function for the 5-LO pathway in obesity-associated inflammatory and metabolic changes in adipose tissue. It should be pointed out that we found similar endogenous levels of LTB₄ and cys-LTs in lean adipose tissue, although LTB₄, but not cys-LT, levels significantly increased in adipose tissue from obese mice. We should also mention that the levels of 5-LO products in adipose tissue detected in our study by both EIA and RP-HPLC analysis were in the picogram range per milligram of tissue. These levels are similar to those reported previously in other tissues by Zhao et al. (33), in mouse aortas (0.3 pg/mg tissue); by Qiu et al. (34), in human carotid plaques (2.2 pg/mg tissue); and by López-Parra et al. (12), in mouse liver (0.6 pg/mg tissue). These data, together with the finding that nanomolar concentrations of 5-LO products were able to induce NF- κ B activity and cytokine production (i.e., MCP-1, IL-6, and TNF- α) in adipose tissue, strongly support the concept that 5-LO products, mainly LTB₄, are involved in the inflammatory state of this tissue in obesity.

To summarize, in the current study we characterize the 5-LO pathway, a potent proinflammatory pathway of the arachidonic acid cascade, as a novel target in prevention of the low-grade inflammatory state in adipose tissue of mice with dietary obesity. In addition, we provide data supporting a role for the 5-LO pathway in signaling the dysfunction of lipid metabolism in adipose tissue that may represent a link between obesity, inflammation, and hepatic steatosis.

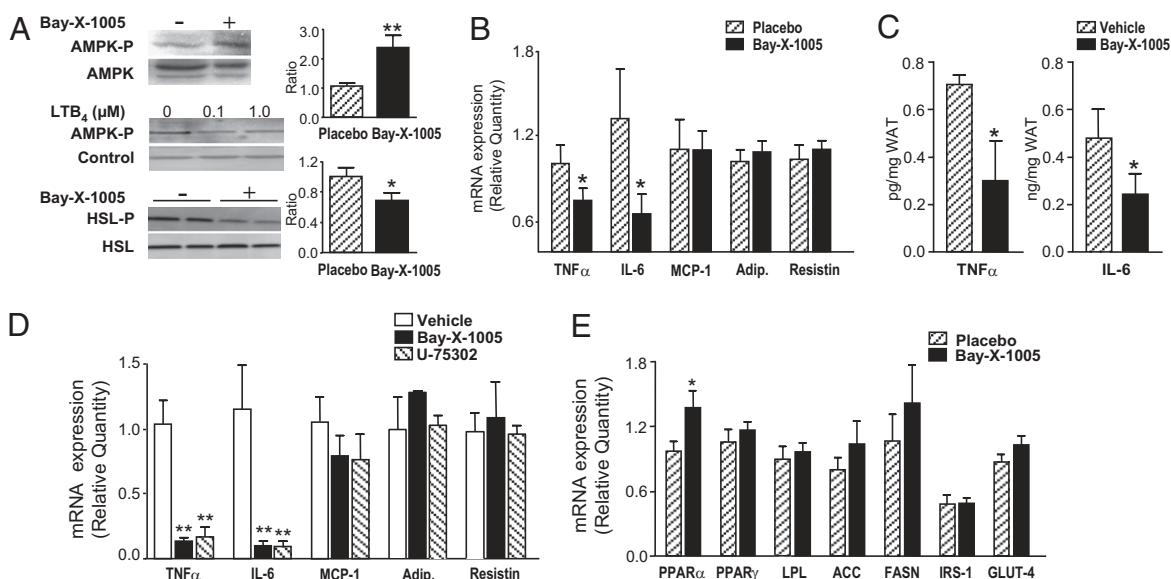


FIGURE 6. FLAP inhibition modulates AMPK activity. *A*, AMPK phosphorylation was determined by Western blot in adipose tissue samples from mice treated with placebo ($n = 10$) or Bay-X-1005 ($n = 10$) (upper panel) and in adipocytes exposed to increasing concentrations of LTB₄ (0, 0.1, and 1 μ M) for 30 min at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere (middle panel). HSL phosphorylation was determined by Western blot in adipose tissue samples from mice treated with either placebo or Bay-X-1005 (lower panel). The densitometric analysis of phosphorylated AMPK/total AMPK and phosphorylated HSL/total HSL ratios is shown in the right panels. *B*, The expression of TNF- α , IL-6, MCP-1, adiponectin, and resistin in adipose tissue samples from mice treated with placebo ($n = 10$) or Bay-X-1005 ($n = 10$) was determined by real-time PCR. *C*, Adipose tissue explants from lean wild-type mice were incubated in the presence of vehicle (0.5% ethanol) or Bay-X-1005 (30 μ M) for 48 h. The levels of TNF- α and IL-6 in the supernatants were determined by specific ELISAs. Results are expressed as the mean ± SEM of two different experiments performed in duplicate. *D*, The expression of adipokines in 3T3-L1 adipocytes incubated with vehicle, Bay-X-1005 (20 μ M), or U-75302 (1 μ M) for 24 h was assessed by real-time PCR. *E*, The expression of genes involved in lipid and glucose metabolism (i.e., PPAR α , PPAR γ , LPL, ACC, FASN, IRS-1, and GLUT-4) was determined by real-time PCR in adipose samples from mice treated with placebo or Bay-X-1005. Results are expressed as the mean ± SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ versus placebo (*A*, *B*, *E*) or versus vehicle (*C*, *D*). Adip, adiponectin.

Acknowledgments

We thank Montse Bernat for technical support.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- Wellen, K. E., and G. S. Hotamisligil. 2003. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 112: 1785–1788.
- Hotamisligil, G. S. 2006. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444: 860–867.
- Roden, M. 2006. Mechanisms of disease: hepatic steatosis in type 2 diabetes—pathogenesis and clinical relevance. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* 2: 335–348.
- Angulo, P. 2002. Nonalcoholic fatty liver disease. *N. Engl. J. Med.* 346: 1221–1231.
- Sanyal, A. J. 2005. Mechanisms of disease: pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* 2: 46–53.
- Samuelsson, B., S. E. Dahlén, J. A. Lindgren, C. A. Rouzer, and C. N. Serhan. 1987. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science* 237: 1171–1176.
- Funk, C. D. 2001. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 294: 1871–1875.
- Bäck, M., A. Sultan, O. Ovchinnikova, and G. K. Hansson. 2007. 5-Lipoxygenase-activating protein: a potential link between innate and adaptive immunity in atherosclerosis and adipose tissue inflammation. *Circ. Res.* 100: 946–949.
- Kaaman, M., M. Rydén, T. Axelsson, E. Nordström, A. Sicard, A. Bouloumié, D. Langin, P. Arner, and I. Dahlman. 2006. ALOX5AP expression, but not gene haplotypes, is associated with obesity and insulin resistance. *Int. J. Obes. (Lond.)* 30: 447–452.
- Mehrabian, M., H. Allayee, J. Stockton, P. Y. Lum, T. A. Drake, L. W. Castellani, M. Suh, C. Armour, S. Edwards, J. Lamb, et al. 2005. Integrating genotypic and expression data in a segregating mouse population to identify 5-lipoxygenase as a susceptibility gene for obesity and bone traits. *Nat. Genet.* 37: 1224–1233.
- Mehrabian, M., F. T. Schulthess, M. Nebohacova, L. W. Castellani, Z. Zhou, J. Hartiala, J. Oberholzer, A. J. Lusis, K. Maedler, and H. Allayee. 2008. Identification of ALOX5 as a gene regulating adiposity and pancreatic function. *Diabetologia* 51: 978–988.
- López-Parra, M., E. Titos, R. Horrillo, N. Ferré, A. González-Pérez, M. Martínez-Clemente, A. Planagumà, J. Masferrer, V. Arroyo, and J. Clària. 2008. Regulatory effects of arachidonate 5-lipoxygenase on hepatic microsomal TG transfer protein activity and VLDL-triglyceride and apoB secretion in obese mice. *J. Lipid Res.* 49: 2513–2523.
- Ho, M., S. Foxall, M. Higginbottom, D. M. Donofrio, J. Liao, P. J. Richardson, and Y. P. Maneuf. 2006. Leptin-mediated inhibition of the insulin-stimulated increase in fatty acid uptake in differentiated 3T3-L1 adipocytes. *Metabolism* 55: 8–12.
- Liao, J., R. Sportsman, J. Harris, and A. Stahl. 2005. Real-time quantification of fatty acid uptake using a novel fluorescence assay. *J. Lipid Res.* 46: 597–602.
- Schwieterman, W., D. Sorrentino, B. J. Potter, J. Rand, C. L. Kiang, D. Stump, and P. D. Berk. 1988. Uptake of oleate by isolated rat adipocytes is mediated by a 40-kDa plasma membrane fatty acid binding protein closely related to that in liver and gut. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 359–363.
- Berk, P. D., S. Zhou, C. Kiang, D. D. Stump, X. Fan, and M. W. Bradbury. 1999. Selective up-regulation of fatty acid uptake by adipocytes characterizes both genetic and diet-induced obesity in rodents. *J. Biol. Chem.* 274: 28626–28631.
- González-Pérez, A., R. Horrillo, N. Ferré, K. Gronert, B. Dong, E. Morán-Salvador, E. Titos, M. Martínez-Clemente, M. López-Parra, V. Arroyo, and J. Clària. 2009. Obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis are alleviated by ω -3 fatty acids: a role for resolvins and protectins. *FASEB J.* 23: 1946–1957.
- Ferré, N., M. Martínez-Clemente, M. López-Parra, A. González-Pérez, R. Horrillo, A. Planagumà, J. Camps, J. Joven, A. Tres, F. Guardiola, et al. 2009. Increased susceptibility to exacerbated liver injury in hypercholesterolemic ApoE-deficient mice: potential involvement of oxysterols. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 296: G553–G562.
- Horrillo, R., A. Planagumà, A. González-Pérez, N. Ferré, E. Titos, R. Miquel, M. López-Parra, J. L. Masferrer, V. Arroyo, and J. Clària. 2007. Comparative protection against liver inflammation and fibrosis by a selective cyclooxygenase-2 inhibitor and a nonredox-type 5-lipoxygenase inhibitor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 323: 778–786.
- Hui, Y., G. Yang, H. Galczenski, D. J. Figueroa, C. P. Austin, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins, and C. D. Funk. 2001. The murine cysteinyl leukotriene 2 (CysLT2) receptor. cDNA and genomic cloning, alternative splicing, and in vitro characterization. *J. Biol. Chem.* 276: 47489–47495.
- Sánchez-Galán, E., A. Gómez-Hernández, C. Vidal, J. L. Martín-Ventura, L. M. Blanco-Colio, B. Muñoz-García, L. Ortega, J. Egido, and J. Tuñón. 2009. Leukotriene B4 enhances the activity of nuclear factor-kappaB pathway through BLT1 and BLT2 receptors in atherosclerosis. *Cardiovasc. Res.* 81: 216–225.
- Bäck, M., D. X. Bu, R. Bränström, Y. Sheikine, Z. Q. Yan, and G. K. Hansson. 2005. Leukotriene B4 signaling through NF-kappaB-dependent BLT1 receptors on vascular smooth muscle cells in atherosclerosis and intimal hyperplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 17501–17506.
- Ghosh, S., and M. S. Hayden. 2008. New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 837–848.
- Sun, B., and M. Karin. 2008. NF-kappaB signaling, liver disease and hepatoprotective agents. *Oncogene* 27: 6228–6244.
- Tilg, H., and A. R. Moschen. 2006. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 6: 772–783.
- Browning, J. D., and J. D. Horton. 2004. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J. Clin. Invest.* 114: 147–152.
- Gowri, M. S., R. K. Azhar, F. B. Kraemer, G. M. Reaven, and S. Azhar. 2000. Masoprocol decreases rat lipolytic activity by decreasing the phosphorylation of HSL. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 279: E593–600.
- Long, Y. C., and J. R. Zierath. 2006. AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J. Clin. Invest.* 116: 1776–1783.
- Daval, M., F. Foufelle, and P. Ferré. 2006. Functions of AMP-activated protein kinase in adipose tissue. *J. Physiol.* 574: 55–62.
- Martin, V., P. Ronde, D. Unett, A. Wong, T. L. Hoffman, A. L. Edinger, R. W. Doms, and C. D. Funk. 1999. Leukotriene binding, signaling, and analysis of HIV coreceptor function in mouse and human leukotriene B4 receptor-transfected cells. *J. Biol. Chem.* 274: 8597–8603.
- Peres, C. M., D. M. Aronoff, C. H. Serezani, N. Flamand, L. H. Faccioli, and M. Peters-Golden. 2007. Specific leukotriene receptors couple to distinct G proteins to effect stimulation of alveolar macrophage host defense functions. *J. Immunol.* 179: 5454–5461.
- Lihn, A. S., N. Jessen, S. B. Pedersen, S. Lund, and B. Richelsen. 2004. AICAR stimulates adiponectin and inhibits cytokines in adipose tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316: 853–858.
- Zhao, L., M. P. Moos, R. Gräbner, F. Pédrone, J. Fan, B. Kaiser, N. John, S. Schmidt, R. Spanbroek, K. Lötzer, et al. 2004. The 5-lipoxygenase pathway promotes pathogenesis of hyperlipidemia-dependent aortic aneurysm. *Nat. Med.* 10: 966–973.
- Qiu, H., A. Gabrielsen, H. E. Agardh, M. Wan, A. Wetterholm, C. H. Wong, U. Hedén, J. Swedenborg, G. K. Hansson, B. Samuelsson, et al. 2006. Expression of 5-lipoxygenase and leukotriene A4 hydrolase in human atherosclerotic lesions correlates with symptoms of plaque instability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 8161–8166.

DISCUSSION

Durant la realització d'aquesta tesi hem investigat les dues vies majoritàries de formació d'eicosanoids, la via de la COX-2 i la de la 5-LO, i el seu paper a la inflamació hepàtica i del teixit adipós. Per això, hem utilitzat dos models experimentals *in vivo* de inflamació: un model de toxicitat i dany hepàtic mitjançant l'administració de CCl₄ i un model d'obesitat induïda amb una dieta rica en greix que produeix inflamació a nivell del teixit adipós.

Amb el primer estudi, hem aportat evidències que ambdues vies COX-2 i 5-LO són factors contribuents a la iniciació i progressió de la inflamació i el dany hepàtic, i que aquestes dues vies proinflamàtores representen potencials dianes terapèutiques. Durant el segon estudi, hem obtingut resultats que ens indiquen que la 5-LO té un paper, no conegut prèviament, a la mediació de l'estat inflamatori de baix grau al teixit adipós i a la disfunció del metabolisme lipídic a l'adipòcit.

Els nostres resultats són consistents amb estudis previs que mostraven una expressió incrementada i un augment a la formació de productes derivats de la COX-2 i la 5-LO a pacients amb malaltia hepàtica crònica i fibrosi avançada (Uemura *et al.*, 1994; Cheng *et al.*, 2002; Mohammed *et al.*, 2004; Núñez *et al.*, 2004) i a animals sotmesos a models experimentals com el dany induït per CCl₄, la malaltia hepàtica alcohòlica i la esteatohepatitis induïda per dieta (Nanji *et al.*, 1997; Titos *et al.*, 2000, 2003, 2005; Planagumà *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2006). A més, els nostres resultats confirmen estudis previs mostrant els efectes protectors dels inhibidors de la COX-2 i la FLAP al fetge (Endoh *et al.*, 1996; Yamamoto *et al.*, 2003; Planagumà *et al.*, 2005; Titos *et al.*, 2005).

Un resultat d'interès del present estudi és que a més de reduir la fibrosi, la inhibició simultània de les vies de la COX-2 i la 5-LO redueix significativament el dany hepàtic necroinflamatori. Aquest efecte no va ser observat després de l'administració per separat de

cada un dels inhibidors, malgrat que en un estudi previ s'havia mostrat que el dany necroinflamatori a rates, determinat segons els nivells de transaminases, es reduïa després de l'administració d'un inhibidor de la COX-2 (Yamamoto *et al.*, 2003). No es coneix si aquests resultats divergents són deguts a les diferents propietats dels inhibidors utilitzats o al fet que els estudis s'hagin fet amb espècies diferents.

De qualsevol manera, els efectes protectors sobre la necroinflamació de la inhibició combinada de la COX-2 i la 5-LO es van confirmar amb l'administració de l'inhibidor de la COX-2 a ratolins deficients per la 5-LO sotmesos a dany hepàtic. Desafortunadament, aquests resultats no van poder ser confirmats amb ratolins deficients per la COX-2 degut a que aquests animals exhibeixen una marcada disminució de la fertilitat i supervivència (Dinchuck *et al.*, 1995).

De fet, els nostres resultats recolzen la idea de que les vies de la COX-2 i la 5-LO tenen funcions convergents, no només a la proliferació cel·lular i angiogènesi *de novo* (Romano i Clària, 2003), sinó també a la progressió de la inflamació i la fibrosi hepàtica.

És important destacar que aquests resultats obren nous fronts per l'aplicació d'inhibidors duals COX/5-LO amb l'habilitat d'inhibir les dues vies. De fet, els inhibidors duals, tal com el licofelone, han mostrat la seva eficàcia al tractament de desordres inflamatoris com l'artritis, l'osteoartritis, l'asma i la malaltia inflamatòria intestinal (Martel-Pelletier *et al.*, 2003; Vidal *et al.*, 2007). Si els inhibidors duals tenen una eficàcia superior que la inhibició d'una única via no està del tot provat, però els inhibidors duals poden prevenir la derivació observada del metabolisme de l'àcid araquidònic cap a la via de la 5-LO quan s'inhibeix la COX (Martel-Pelletier *et al.*, 2003), tenint així un perfil gastrointestinal excel·lent, molt millor que els fàrmacs no esteroïdals convencionals i equivalent als inhibidors selectius per la COX-2 (Laufer *et al.*, 1994; Wallace *et al.*, 1994). A més, els inhibidors duals sembla que tenen efectes moduladors a certes malalties,

per exemple, poden parar la progressió de l'artritis disminuint l'expressió de la MMP-3 i la IL-1 β (Celotti i Durand, 2003).

Els nostres resultats indiquen que els efectes hepàtics exercits per el SC-236 i el CJ-13,610 són deguts a una combinació de mecanismes, involucrant no només la inhibició dels productes proinflamatoris derivats de la 5-LO i la COX-2 sinó també de la inducció de l'apoptosi a cèl·lules no parenquimals. Diverses evidències indiquen que el procés d'apoptosi a les cèl·lules hepàtiques estelades és central per parar la progressió de la fibrosi i representa una important estratègia antifibrogènica al fetge (Iredale *et al.*, 1998; Friedman i Bansal, 2006). De fet, al nostre estudi vam observar que la reducció de la fibrosi hepàtica associada amb la inhibició de la COX-2 i la 5-LO va ser paral·lela a la inducció de la mort cel·lular a cèl·lules hepàtiques no parenquimals (cèl·lules estelades i macròfags hepàtics). Aquests resultats són consistents amb estudis previs que demostren que inhibidors de la COX-2 i de la 5-LO indueixen l'apoptosi a cèl·lules estelades hepàtiques i a cèl·lules de Kupffer en cultiu primari (Titos *et al.*, 2003; Planagumà *et al.*, 2005). A més a més, consistent amb el seu paper al dany hepàtic, s'havia demostrat amb anterioritat que la depleció parcial de cèl·lules de Kupffer té un efecte preventiu sobre el dany necroinflamatori (Duffield *et al.*, 2005; Titos *et al.*, 2005).

També s'ha de tenir en compte que altres mecanismes independents de la directa inhibició de la COX-2 i la 5-LO podrien estar involucrats a les accions hepatoprotectores exercides per el SC-236 i el CJ-13,610. Per exemple, el SC-236 i altres inhibidors de la COX-2 semblen produir accions a través de l'activació del PPAR γ , un factor de transcripció involucrat en els efectes antiinflamatoris i antifibrogènics al fetge (Marra *et al.*, 2000; López-Parra *et al.*, 2005; Planagumà *et al.*, 2005). Un altre mecanisme possible per el qual els inhibidors convencionals de la 5-LO poden exercir efectes protectors en contra el dany hepàtic induït per CCl $_4$ és per la interferència amb el metabolisme del citocrom P-450 al fetge o per produir efectes antioxidants.

En el nostre cas, aquesta possibilitat no és probable degut a que el CJ-13,610 és un inhibidor de la 5-LO de tipus no redox sense propietats redox i no complexant del ferro (Fischer *et al.*, 2004).

Encara que al fetge hem vist que és necessària la inhibició de la COX-2 i la 5-LO per reduir la inflamació, els resultats d'aquest estudi ens indiquen que la inhibició de la via de la 5-LO és suficient per disminuir la inflamació al teixit adipós; on aquesta via presenta un paper que no s'havia conegut prèviament a la mediació de l'estat inflamatori de baix grau associat a la obesitat i a la disfunció lipídica. En concret, hem demostrat *in vivo* que la inhibició farmacològica de la FLAP en un model animal d'obesitat induïda per dieta resulta en una disminució dels macròfags infiltrats i en els nivells de les citokines proinflamatòries IL-6 i TNF α al teixit adipós.

A nivell *in vitro*, també hem desvelat l'impacte dels mediadors lipídics derivats de la 5-LO a la inflamació del teixit adipós (és a dir, a l'activitat NF- κ B i la secreció d'adipoquines proinflamatòries). Presentem resultats que demostren que els productes de la 5-LO potencien significativament la translocació nuclear de les subunitats p50 i p65 i la conseqüent inducció de l'activitat NF- κ B a explants de teixit adipós. Encara que l'activació d'aquest receptor nuclear per LTs ha estat descrita a monòcits i cèl·lules vasculares del múscul llis (Sánchez-Galán *et al.*, 2009; Bäck *et al.*, 2005), aquesta és la primera vegada que es demostra que els productes de la 5-LO modulen la via del NF- κ B al teixit adipós. L'activació transcripcional del NF- κ B indueix un estat de inflamació de baix grau i estimula la producció de molècules proinflamatòries, induint la resistència a la insulina i l'esteatosi hepàtica (Ghosh *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2008).

Al nostre estudi, hem detectat també que els productes de la 5-LO incrementen la inducció de la secreció al medi de citokines i quimioquines, moltes sota la regulació de NF- κ B.

D'entre aquestes molècules vam detectar adipoquines directament involucrades en la patogènesi del síndrome metabòlic tal com MCP-1, IL-6 i TNF α , que connecten la inflamació del teixit adipós amb la resistència a la insulina i la esteatosi hepàtica (Tilg *et al.*, 2006). Consistent amb aquest paper de la 5-LO modulant l'expressió i secreció de la IL-6. Al primer estudi vam observar que la inhibició de la 5-LO disminuïa l'expressió de la IL-6 a macròfags. En canvi, la inhibició de la COX-2 va amplificar la seva expressió. Aquests resultats recolzen el concepte que la COX-2 i la 5-LO tenen papers oposats a la regulació de l'expressió de la IL-6, un factor determinant a la iniciació del procés d'inflamació hepàtica (McClain *et al.*, 1999). Els nostres resultats són consistents amb estudis anteriors que mostraven el potencial dels productes derivats de la COX-2 i la 5-LO en la modulació de l'expressió i la síntesi de citocines proinflamàtores a monòcits i macròfags (Sipe *et al.*, 1992; Marcouiller *et al.*, 2005). Interessantment, un efecte inhibitori similar al que va exercir la inhibició de la 5-LO es va observar amb un antagonista del receptor LTB₁, suggerint que el LTB₄ està involucrat directament a la regulació de l'expressió de la IL-6 als macròfags. Aquests resultats són coherents amb la idea que diferents eicosanoids, els productes de la 5-LO, i en particular el LTB₄, són senyals positives per a l'expressió i síntesi de citocines a les cèl·lules inflamatòries (Sipe *et al.*, 1992; Marcouiller *et al.*, 2005). De la mateixa manera, els productes de la 5-LO van ser capaços de potenciar la secreció de la citocina proinflamatòria MCP-1 als experiments *ex vivo* amb explants de teixit adipós. En canvi, el teixit adipós de ratolins tractats amb l'inhibidor de la FLAP no presentava una reducció significativa de l'expressió d'aquesta citocina, però sí al fetge dels ratolins deficients per la 5-LO sotmesos a una inhibició farmacològica de la COX-2. Això ens indica que a nivell *in vivo*, és necessària la inhibició simultània d'ambdues vies per disminuir el MCP-1. Aquesta citocina exhibeix una potent activitat quimiotàctica per monòcits, limfòcits i cèl·lules mesenquimals, incloent cèl·lules hepàtiques estelades (Marra *et al.*, 1999; Muller, 2001). Diverses evidències indiquen que els productes de la 5-LO, particularment el

LTB₄, indueixen marcadament l'expressió del mRNA i la proteïna del MCP-1 i que els productes derivats de la COX modulen l'expressió del MCP-1 d'una manera agonista específic (Efsen *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2004). Considerant que un augment a l'expressió del MCP-1 contribueix al desenvolupament de la resposta inflamatòria a pacients amb fibrogènesi activa (Marra *et al.*, 1998), una disminució de l'expressió d'aquesta quimioquina proinflamatòria podria ser considerada com una acció protectora addicional associada a la inhibició simultània de les vies de la COX-2 i la 5-LO. De fet, un estudi recent ha demostrat que la inhibició dual COX/5-LO atenua el reclutament de monòcits a la paret arterial per mecanismes relacionats amb la inhibició del MCP-1 (Vidal *et al.*, 2007).

D'una altra banda, a més de contribuir a la progressió de la inflamació del teixit adipós, els nostres resultats donen evidències de que la via de la 5-LO també contribueix a la regulació del flux d'àcids grassos lliures procedent del teixit adipós. La inflamació al teixit adipós és un desordre associat a l'estat de inflamació de baix grau induït per l'obesitat, la qual està relacionada amb altres complicacions clíniques tal com la resistència a la insulina, la diabetis, l'aterosclerosi i l'esteatosi (Ferrante, 2007). D'acord amb les explicacions convencionals, un increment a la massa d'adipòcits i a la lipòlisi (és a dir, la hidròlisi de triglicèrids) contribueix a uns nivells elevats dels àcids grassos lliures, que juguen un paper crític a la resistència a la insulina i l'esteatosi hepàtica associades a l'obesitat a través d'un increment a l'activitat de la HSL (Browning i Horton, 2004). Al nostre estudi, el LTB₄, però no el LTD₄, redueix l'entrada d'àcids grassos lliures als adipòcits mentre que la inhibició de la via de la 5-LO disminueix l'activitat HSL i la taxa lipolítica al teixit adipós. Efectes similars a l'activitat lipolítica i la fosforilació de la HSL s'havien trobat prèviament amb l'ús del masoprocol, un inhibidor no selectiu de LO (Gowri *et al.*, 2000) i al transport dels lípids als hepatòcits amb l'inhibidor selectiu de la 5-LO CJ-13,610 (López-Parra *et al.*, 2008). Les conseqüències fisiològiques d'aquests canvis a la funció del teixit adipós van ser corroborades *in vivo* amb l'observació que la inhibició

de la 5-LO redueix els nivells circulants d'àcids grassos lliures i millora la resistència a la insulina i l'esteatosi hepàtica als ratolins induïts a l'obesitat amb la dieta rica en greix. Aquests resultats són consistents amb estudis recents del nostre grup, en els que la 5-LO s'ha establert com un important factor esteatogènic a ratolins obesos *ob/ob* i a ratolins sotmesos a un model d'hiperlipidèmia (López-Parra *et al.*, 2008; Martínez-Clemente *et al.*, 2009).

Els resultats del present estudi també aporten un mecanisme a través del qual la via de la 5-LO pot tenir efectes sobre la funció del teixit adipós. D'acord amb les nostres dades, la via de la 5-LO està involucrada a la inflamació del teixit adipós i la disfunció lipídica. Aquests efectes estan relacionats amb l'activació de la AMPK, que és un component regulador clau a l'homeòstasi de l'energia a diversos tipus cel·lulars, inclosos els adipòcits (Long i Zierath, 2006; Daval *et al.*, 2006). Per tant, els efectes beneficiosos de la inhibició de la via de la 5-LO semblen ser mediatos per la inducció de l'activitat AMPK al teixit adipós amb una conseqüent regulació de l'activitat HSL i la secreció de TNF α i IL-6, dianes directes de la AMPK en aquest òrgan. La AMPK respon a canvis a l'estat energètic cel·lular, per tant, si la ràtio AMP/ATP està incrementada aquest enzim es fosforila i s'activa per restaurar els nivells energètics, inhibint les vies que consumeixen ATP i activant les vies que produeixen ATP (Long i Zierath, 2006; Daval *et al.*, 2006). Als nostres experiments, la inhibició de la via de la 5-LO amb l'inhibidor de la FLAP resulta en una inducció de la fosforilació de la AMPK al teixit adipós. Conseqüentment, el producte de la 5-LO LTB $_4$ modula la fosforilació de AMPK als adipòcits. Els mecanismes responsables d'aquests resultats no estan del tot definits, però els nostres resultats són consistents amb publicacions prèvies demostrant que el LTB $_4$ inhibeix els compostos de AMP (Martin *et al.*, 1999; Peres *et al.*, 2007). Per una altra banda, la via de la AMPK té efectes a la regulació del metabolisme lipídic. Al nostre estudi, l'activació de la AMPK induïda per la inhibició de la FLAP es va acompanyar per la disminució de l'activitat de la HSL, que controla l'alliberament dels àcids grassos lliures pel teixit adipós (Long i Zierath, 2006; Daval *et al.*,

2006). A més, la inhibició de la FLAP disminueix l'expressió i la secreció de la IL-6 i el TNF α , dues adipoquines involucrades a la resistència a la insulina i l'esteatosi hepàtica i que a més estan directament modulades per la AMPK (Lihn *et al.*, 2004). Reduccions similars de l'alliberament de IL-6 i TNF α s'han trobat amb la incubació d'explants de teixit adipós amb AICAR, una activador sintètic de la AMPK (Lihn *et al.*, 2004).

En aquest estudi, hem detectat per primer cop l'expressió constitutiva de tots els enzims implicats a la formació de LTB₄, cis-LTs i 5-HETE tant al teixit adipós com a les fraccions cel·lulars del teixit adipós: els adipòcits i les SVC. A més, en aquestes mostres vam detectar l'expressió dels dos receptors que reconeixen el LTB₄ (el LTB-1 i el LTB-2) i els dos receptors que reconeixen els cis-LTs (el CisLT-1 i el CisLT-2), possibilitant un efecte directe dels LTs sobre aquestes cèl·lules. Consistent amb estudis anteriors mostrant la presència de la proteïna de la FLAP i la 5-LO a adipòcits i la inducció de la seva expressió al teixit adipós obès (Bäck *et al.*, 2007; Kaaman *et al.*, 2006), en aquest estudi mostrem que l'expressió de la FLAP i els nivells de LTB₄ estan incrementats amb l'obesitat, suggerint una potencial nova funció per a la via de la 5-LO als canvis inflamatoris i metabòlics associats a la obesitat en el teixit adipós. Hem de destacar que vam trobar nivells endògens similars per LTB₄ i cis-LTs al teixit adipós de ratolins primers, encara que els nivells de LTB₄ però no els dels cis-LT van incrementar significativament al teixit adipós de ratolins obesos. Els nivells dels productes de la 5-LO detectats al teixit adipós en aquest estudi mitjançant l'anàlisi amb EIA i RP-HPLC estaven al rang de picograms per mg de teixit. Aquests nivells són similars als que s'havien publicat prèviament a altres teixits (Zhao *et al.*, 2004; Qiu *et al.*, 2006; López-Parra *et al.*, 2008). Aquestes dades en conjunt amb els resultats obtinguts de que concentracions nanomolars de productes de la 5-LO van ser capaços d'induir l'activitat NF- κ B i la producció de citoquines al teixit adipós, donen suport al concepte que els productes de la 5-LO, principalment el LTB₄, estan involucrats a l'estat inflamatori d'aquest teixit a l'obesitat.

Per una altra banda, encara que els efectes de la COX-2 sobre el teixit adipós s'havien atribuït exclusivament a la modulació de l'adipogènesi, recentment s'ha demostrat que la inhibició selectiva de la COX-2 amb celecoxib disminueix l'infiltrat de macròfags i l'expressió de TNF α al teixit adipós, i la resistència a la insulina a rates induïdes a l'obesitat (Hsieh *et al.*, 2009). Queda per explorar, si tal com hem demostrat en aquest estudi per a la 5-LO, la COX-2 és capaç de modular el transport lipídic al teixit adipós, a més de ser un mediador adipós proinflamatori.

En resum, els resultats presentats en aquesta tesi demostren, per una banda, la participació d'ambdues vies COX-2 i 5-LO a l'augment de la resposta inflamatòria i la subseqüent fibrogènesi en un model preclínic de malaltia hepàtica. I per una altra part, hem aportat resultats que atribueixen un nou paper a la via de la 5-LO modulant la disfunció del metabolisme lipídic i l'estat d'inflamació de baix grau al teixit adipós, que ens indiquen que aquesta via pot presentar un nexa entre l'obesitat, la inflamació i l'esteatosi hepàtica.

En conjunt, la modulació dels eicosanoids derivats de la via de la COX-2 i la 5-LO representa una potencial estratègia terapèutica en aquests teixits estudiats.

CONCLUSIONS

Els estudis portats a terme durant aquesta tesi indiquen que:

- 1) La inhibició de la COX-2 amb SC-236, la de la 5-LO amb CJ-13,6210 o la combinació d'ambdós inhibidors disminueix la fibrosi hepàtica i indueix l'apoptosi a cèl·lules hepàtiques no parenquimals a ratolins tractats amb CCl₄.
- 2) La inhibició simultània de les dues vies redueix el dany necroinflamatori hepàtic a ratolins tractats amb CCl₄.
- 3) L'administració de SC-236 a ratolins deficients per la 5-LO tractats amb CCl₄ redueix el dany necroinflamatori i l'expressió hepàtica de MCP-1.
- 4) En els macròfags en cultiu, la combinació de SC-236 i CJ-13,610 produeix una inhibició superior sobre la biosíntesi d'eicosanoids que l'inhibidor dual licofelone.
- 5) La inhibició de la 5-LO redueix l'expressió de IL-6 a macròfags. Aquest efecte està mediat per el receptor LTB₁ del LTB₄.
- 6) El teixit adipós expressa el mRNA de tots els enzims necessaris per a la biosíntesi de leucotriens així com el dels seus receptors.
- 7) El teixit adipós de ratolins obesos presenta un increment de l'expressió de la FLAP i dels nivells de LTB₄.
- 8) Els productes derivats de la 5-LO incrementen la resposta inflamatòria al teixit adipós: augmenten l'activitat NF- κ B i indueixen la secreció d'adipoquines.
- 9) La via de la 5-LO modula el transport d'àcids grassos lliures: el LTB₄ disminueix l'entrada en adipòcits aïllats i la seva inhibició en disminueix la lipòlisi al teixit adipós.
- 10) La inhibició de la via de la 5-LO, amb Bay-X-1005, disminueix la inflamació del teixit adipós, l'esteatosi hepàtica, els nivells sèrics d'àcids grassos lliures i millora la sensibilitat a la insulina a ratolins obesos.

- 11) La inhibició de la via de la 5-LO disminueix l'expressió dels gens proinflamatoris IL-6 i $\text{TNF}\alpha$ al teixit adipós i als adipòcits, i modula el $\text{PPAR}\alpha$, l'activitat de la AMPK i de la HSL.

En conjunt, aquests resultats ens indiquen que els eicosanoids, mediadors lipídics derivats de l'àcid araquidònic, tenen una paper regulador de la inflamació tissular.

A nivell del fetge la inhibició simultània de la via de la COX-2 i la 5-LO exerceix un efecte preventiu del dany hepàtic necroinflamatori i la fibrogènesi. A nivell de teixit adipós la via de la 5-LO és una nova diana en la prevenció de l'estat inflamatori i de la disfunció lipídica. Això ens indica que aquestes vies representen una potencial estratègia terapèutica en aquests teixits estudiats.

BIBLIOGRAFIA

- Adinolfi LE, Gambardella M, Andreana A, Tripodi MF, Utili R, Ruggiero G. Steatosis accelerates the progression of liver damage of chronic hepatitis C patients and correlates with specific HCV genotype and visceral obesity. *Hepatology* **33**: 1358-1364 (2001).
- Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N. Engl. J. Med.* **346**: 1221-1231 (2002).
- Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li ZW, Long JM, Wynshaw-Boris A, Poli G, Olefsky J, Karin M. IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat. Med.* **11**: 191-198 (2005).
- Arner P. The inflammation orchestra in adipose tissue. *J. Internal Med.* **262**: 404-407 (2007).
- Athari A, Hanecke K, Jungermann K. Prostaglandin F2 alpha and D2 release from primary Ito cell cultures after stimulation with noradrenaline and ATP but not adenosine. *Hepatology* **20**: 142-148 (1994).
- Bäck M, Bu DX, Bränström R, Sheikine Y, Yan ZQ, Hansson GK. Leukotriene B4 signaling through NF-kappaB-dependent BLT1 receptors on vascular smooth muscle cells in atherosclerosis and intimal hyperplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**: 17501-17506 (2005).
- Bäck M, Sultan A, Ovchinnikova O, Hansson GK. 5-Lipoxygenase-activating protein: a potential link between innate and adaptive immunity in atherosclerosis and adipose tissue inflammation. *Circ. Res.* **100**: 946-949 (2007).
- Balsinde J, Winstead MV, Dennis EA. Phospholipase A2 regulation of arachidonic acid mobilization. *FEBS Lett.* **531**: 2-6 (2002).
- Barrios-Rodiles M, Tiralocche G, Chadee K. Lipopolysaccharide modulates cyclooxygenase-2 transcriptionally and posttranscriptionally in human macrophages independently from endogenous IL-1beta and TNF-alpha. *J. Immunol.* **163**: 963-969 (1999).
- Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J. Clin. Invest.* **115**: 209-218 (2005).
- Bataller R, Gines P, Nicolas JM, Gorbic MN, Garcia-Ramallo E, Gasull X, Bosch J, Arroyo V, Rodés J. Angiotensin II induces contraction and proliferation of human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* **118**: 1149-1156 (2000).
- Baud L, Perez J, Denis M, Ardaillou R. Modulation of fibroblast proliferation by sulfidopeptide leukotrienes: effect of indomethacin. *J. Immunol.* **138**: 1190-1195 (1987).
- Baud L, Sraer J, Perez J, Nivez MP, Ardaillou R. Leukotriene C4 binds to human glomerular epithelial cells and promotes their proliferation in vitro. *J. Clin. Invest.* **76**: 374-377 (1985).

- Berk PD, Zhou S, Kiang C, Stump DD, Fan X, Bradbury MW. Selective up-regulation of fatty acid uptake by adipocytes characterizes both genetic and diet-induced obesity in rodents. *J. Biol. Chem.* **274**: 28626-28631 (1999).
- Bourlier V, Zakaroff-Girard A, Miranville A, De Barros S, Maumus M, Sengenès C, Galitzky J, Lafontan M, Karpe F, Frayn KN, Bouloumié A. Remodeling phenotype of human subcutaneous adipose tissue macrophages. *Circulation* **117**: 806-815 (2008).
- Bowers RC, Hevko J, Henson PM, Murphy RC. A novel glutathione containing eicosanoid (FOG7) chemotactic for human granulocytes. *J. Biol. Chem.* **275**: 29931-29934 (2000).
- Brake DK, Smith EO, Mersmann H, Smith CW, Robker RL. ICAM-1 expression in adipose tissue: effects of diet induced obesity in mice. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **291**: C1232-1239 (2006).
- Brash AR. Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J. Biol. Chem.* **274**: 23679-23682 (1999).
- Breyer RM, Bagdassarian CK, Myers SA, Breyer MD. Prostanoid receptors: subtypes and signaling. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **41**: 661-690 (2001).
- Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J. Clin. Invest.* **114**: 147-152 (2004).
- Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N. Engl. J. Med.* **348**: 1625-1638 (2003).
- Cancello R, Tordjman J, Poitou C, Guilhem G, Bouillot JL, Hugol D, Coussieu C, Basdevant A, Bar Hen A, Bedossa P, Guerre-Millo M, Clément K. Increased infiltration of macrophages in omental adipose tissue is associated with marked hepatic lesions in morbid human obesity. *Diabetes* **55**: 1554-1561 (2006).
- Cancello R, Henegar C, Viguerie N, Taleb S, Poitou C, Roualt C, Coupaye M, Pelloux V, Hugol D, Bouillot JL, Bouloumié A, Barbatelli G, Cinti S, Svensson PA, Barsh GS, Zucker JD, Basdevant A, Langin D, Clément K. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes* **54**: 2277-2286 (2005).
- Caspar-Bauguil S, Cousin B, Galinier A, Segafredo C, Nibbelink M, Andre M, Casteilla L, Pénicaud L. Adipose tissues as an ancestral immune organ: site specific change in obesity. *FEBS Lett.* **579**: 3487-3492 (2005).

- Celotti F, Durand T. The metabolic effects of inhibitors of 5-lipoxygenase and of cyclooxygenase 1 and 2 are an advancement in the efficacy and safety of anti-inflammatory therapy. *Prostaglandins Other Lipid. Mediat.* **71**: 147-162 (2001).
- Chen B, Lam KS, Wang Y, Wu D, Lam MC, Shen J, Wong L, Hoo RL, Zhang J, Xu A. Hypoxia dysregulates the production of adiponectin and plasminogen activator inhibitor-1 independent of reactive oxygen species in adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **341**: 549-556 (2006).
- Cheng AS, Chan HL, Leung WK, To KF, Go MY, Chan JY, Liew CT, Sung JJ. Expression of HBx and COX-2 in chronic hepatitis B, cirrhosis and hepatocellular carcinoma: implication of HBx in upregulation of COX-2. *Mod. Pathol.* **17**: 1169-79 (2004).
- Cheng J, Imanishi H, Iijima H, Shimomura S, Yamamoto T, Amuro Y, Kubota A, Hada T. Expression of cyclooxygenase 2 and cytosolic phospholipase A(2) in the liver tissue of patients with chronic hepatitis and liver cirrhosis. *Hepatol. Res.* **23**: 185-95 (2002a).
- Cheng J, Imanishi H, Liu W, Iwasaki A, Ueki N, Nakamura H, Hada T. Inhibition of the expression of alpha-smooth muscle actin in human hepatic stellate cell line, LI90, by a selective cyclooxygenase 2 inhibitor, NS-398. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **297**: 1128-1134 (2002b).
- Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, Wang S, Fortier M, Greenberg AS, Obin MS. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J. Lipid Res.* **46**: 2347-2355 (2005).
- Cipollone F, Iezzi A, Fazia M, Zucchelli M, Pini B, Cucurullo C, De Cesare D, De Blasis G, Muraro R, Bei R, Chiarelli F, Schmidt AM, Cucurullo F, Mezzetti A. The receptor RAGE as a progression factor amplifying arachidonate-dependent inflammatory and proteolytic response in human atherosclerotic plaques: role of glycemic control. *Circulation* **108**: 1070-1077 (2003).
- Clària J, Serhan CN. Aspirin triggers previously unrecognized bioactive eicosanoids by human endothelial cell-leukocyte interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 9475-9479 (1995).
- Clària J, Jiménez W. Renal dysfunction and ascites in carbon tetrachloride-induced cirrhosis in rats. A: Arroyo V, Ginés P, Rodés J, Schrier RW, eds. Ascites and renal dysfunction in liver disease. Pathogenesis, diagnosis and treatment. Malden, MA. USA: Blackwell Science Inc. Chapter 22, 379-396 (1999).

- Clària J, López-Parra M. New perspectives in the modulation of the eicosanoid cascade in inflammation. *Letters in Drug Design and Discovery* **2**: 391-402 (2005).
- Clària J, Titos E, Jiménez W, Ros J, Ginés P, Arroyo V, Rivera F, Rodés J. Altered biosynthesis of leukotrienes and lipoxins and host defense disorders in patients with cirrhosis and ascites. *Gastroenterology* **115**: 147-156 (1998).
- Clària J, Titos E. La célula de Kupffer. *Gastroenterol. Hepatol.* **27**: 264-273 (2004).
- Clària J. Cyclooxygenase-2 biology. *Curr. Pharm. Des.* **9**: 2177-2190 (2003).
- Constandinou C, Henderson N, Iredale JP. Modeling liver fibrosis in rodents. *Methods Mol. Med.* **117**: 237-250 (2005).
- Cosentino F, Eto M, De Paolis P, van der Loo B, Bachschmid M, Ullrich V, Kouroedov A, Delli Gatti C, Joch H, Volpe M, Luscher TF. High glucose causes upregulation of cyclooxygenase-2 and alters prostanoid profile in human endothelial cells: role of protein kinase C and reactive oxygen species. *Circulation* **107**: 1017-1023 (2003).
- Daval M, Foufelle F, Ferré P. Functions of AMP-activated protein kinase in adipose tissue. *J. Physiol.* **574**: 55-62 (2006).
- Davies DR, Mamat B, Magnusson OT, Christensen J, Haraldsson MH, Pease B, Hansen E, Singh J, Zembower D, Kim H, Kiselyov AS, Burgin AB, Gurney ME, Stewart LJ. Discovery of leukotriene A4 hydrolase inhibitors using metabolomics biased fragment crystallography. *J. Med. Chem.* **52**: 4694-4715 (2009).
- Davies RA, Knight B, Tian YW, Yeoh GC, Olynyk JK. Hepatic oval cell response to the choline-deficient, ethionine supplemented model of murine liver injury is attenuated by the administration of a cyclo-oxygenase 2 inhibitor. *Carcinogenesis* **27**: 1607-1616 (2006).
- Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* **114**: 842-845 (1998).
- Day CP. Non-alcoholic fatty liver disease: current concepts and management strategies. *Clin. Med.* **6**: 19-25 (2006).
- de Luca C, Olefsky JM. Inflammation and insulin resistance. *FEBS Lett.* **582**: 97-105 (2006).
- Decker K. Eicosanoids, signal molecules of liver cells. *Semin. Liver Dis.* **5**: 175-190 (1985).

- Dela Peña A, Leclercq IA, Williams J, Farrell GC. NADPH oxidase is not an essential mediator of oxidative stress or liver injury in murine MCD diet-induced steatohepatitis. *J. Hepatol.* **46**: 304-313 (2007).
- Dienstag JL, Goldin RD, Healthcote EJ, Hann HW, Woessner M, Stephenson SL, Garner S, Gray DF, Schiff ER. Histological outcome during long-term lamivudine therapy. *Gastroenterology* **124**: 105-117 (2003).
- Dinchuck JE, Car BD, Focht RJ, Johnston JJ, Jaffe BD, Covington MB, Contel NR, Eng VM, Collins RJ, Czerniak PM, Gorry SA, Trzaskos JM. Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II. *Nature* **378**: 406-409 (1995).
- Dixon RA, Diehl RE, Opas E, Rands E, Vickers PJ, Evans JF, Gillard JW, Miller DK. Requirement of a 5-lipoxygenase-activating protein for leukotriene synthesis. *Nature* **343**: 282-284 (1990).
- Drazen JM, Israel E, O'Byrne PM. Treatment of asthma with drugs modifying the leukotriene pathway. *N. Engl. J. Med.* **340**: 197-206 (1999).
- Duchatelle V, Marcellin P, Giostra E, Bregeaud L, Pouteau M, Boyer N, Auperin A, Guerret S, Erlinger S, Henin D, Degott C. Changes in liver fibrosis at the end of alpha interferon therapy and 6 to 18 months later in patients with chronic hepatitis C: quantitative assessment by morphometric method. *J. Hepatol.* **29**: 20-28 (1998).
- Duffield JS, Forbes SJ, Constandinou CM, Clay S, Partolina M, Vuthoori S, Wu S, Lang R, Iredale JP. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J. Clin. Invest.* **115**: 56-65 (2005).
- Dwyer JH, Allayee H, Dwyer KM, Fan J, Wu H, Mar R, Luscis AJ, Mehrabian M. Arachidonate 5-lipoxygenase promoter genotype, dietary arachidonic acid, and atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.* **350**: 29-37 (2004).
- Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardello FM, Ferrenbach S, DuBois RN. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* **107**: 1183-1188 (1994).
- Efsen E, Bonacchi A, Pastacaldi S, Valente AJ, Wenzel UO, Tosti-Guerra C, Pinzani M, Laffi G, Abboud HE, Gentilini P, Marra F. Agonist-specific regulation of monocyte chemoattractant protein-1 expression by cyclooxygenase metabolites in hepatic stellate cells. *Hepatology* **33**: 713-721 (2001).

- Endoh T, Tang Q, Denda A, Noguchi O, Kobayashi E, Tamura K, Horiguchi K, Ogasawara H, Tsujiuchi T, Nakae D, Sugimura M, Konishi Y. Inhibition by acetylsalicylic acid, a cyclooxygenase inhibitor, and p-bromophenacylbromide, a phospholipase A2 inhibitor, of both cirrhosis and enzyme-altered nodules caused by a choline-deficient, L-amino acid-defined diet in rats. *Carcinogenesis* **17**: 467-475 (1996).
- Enomoto N, Ikejima K, Yamashina S, Enomoto A, Nishiura T, Nishimura T, Brenner DA, Schemmer P, Bradford BU, Rivera CA, Zhong Z, Thurman RG. Kupffer cell-derived prostaglandin E2 is involved in alcohol-induced fat accumulation in rat liver. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **279**: G100-G106 (2000).
- Evans RM, Barish GD, Wang YX. PPARs and the complex journey to obesity. *Nat. Med.* **10**: 355-361 (2004).
- Ferrante A W Jr. Obesity-induced inflammation: a metabolic dialogue in the language of inflammation. *Journal of Internal Medicine* **262**: 404-414 (2007).
- Fiorucci S, Meli R, Bucci M, Cirino G. Dual inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. A new avenue in antiinflammatory therapy? *Biochem. Pharmacol.* **62**: 1433-1438 (2001).
- Fischer L, Steinhilber D, Werz O. Molecular pharmacological profile of the nonredox-type 5-lipoxygenase inhibitor CJ-13,610. *Br. J. Pharmacol.* **142**: 861-868 (2004).
- FitzGerald GA, Patrono C. The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *N. Engl. J. Med.* **345**: 433-442 (2001).
- FitzGerald GA. COX-2 and beyond: Approaches to prostaglandin inhibition in human disease. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2**: 879-890 (2003).
- Fontana L, Eagon JC, Trujillo ME, Scherer PE, Klein S. Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. *Diabetes* **56**: 1010-1013 (2007).
- Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* **83**: 803-812 (1995).
- Friedman SL, Roll FJ, Boyles J, Bissell DM. Hepatic lipocytes: the principal collagen producing cells of normal rat liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 8681-8685 (1985).

- Friedman SL, Arthur MJ. Activation of cultured rat hepatic lipocytes by Kupffer cell conditioned medium. Direct enhancement of matrix synthesis and stimulation of cell proliferation via induction of platelet-derived growth factor receptors. *J. Clin. Invest.* **84**: 1780-1785 (1989).
- Friedman SL, Bansal MB. Reversal of hepatic fibrosis - Fact or fantasy? *Hepatology* **43**: S82-88 (2006).
- Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury *J. Biol. Chem.* **275**: 2247-2250 (2000).
- Fukai F, Suzuki Y, Nishizawa Y, Katayama T. Transcellular biosynthesis of cysteinyl leukotrienes by Kupffer cell-hepatocyte cooperation in rat liver. *Cell. Biol. Int.* **20**: 423-428 (1996).
- Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* **294**: 1871-1875 (2001).
- Geerts A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin. Liver Dis.* **21**: 311-335 (2001).
- Ghosh S, Hayden MS. New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **8**: 837-848 (2008).
- Gilroy DW, Lawrence T, Perretti M, Rossi AG. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**: 401-416 (2004).
- Ginés P, Cardenas A, Arroyo V, Rodés J. Management of cirrhosis and ascites. *N. Engl. J. Med.* **350**: 1646-1654 (2004).
- Girard J, Lafontan M. Impact of visceral adipose tissue on liver metabolism and insulin resistance. Part II: Visceral adipose tissue production and liver metabolism. *Diabetes Metab.* **34**: 439-445 (2008).
- Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* **3**: 23-35 (2003).
- Gordon S. Macrophage heterogeneity and tissue lipids. *J. Clin. Invest.* **117**: 89-93 (2007).
- Gowri MS, Azhar RK, Kraemer FB, Reaven GM, Azhar S. Masoprocol decreases rat lipolytic activity by decreasing the phosphorylation of HSL. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **279**: E593-600 (2000).
- Graupera M, Garcia-Pagan JC, Titos E, Clària J, Massaguer A, Bosch J, Rodés J. 5-lipoxygenase inhibition reduces intrahepatic vascular resistance of cirrhotic rat livers: a possible role of cysteinyl-leukotrienes. *Gastroenterology* **122**: 387-393 (2002).

Gronert K, Clish CB, Romano M, Serhan CN. Transcellular regulation of eicosanoid biosynthesis. *Methods Mol. Biol.* **120**: 119-144 (1999).

Groop LC, Saloranta C, Shank M, Bonadonna RC, Ferrannini E, DeFronzo RA. The role of free fatty acid metabolism in the pathogenesis of insulin resistance in obesity and noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **72**: 96-107 (1991).

Grosser T, Fries S, FitzGerald GA. Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. *J. Clin. Invest.* **116**: 4-15 (2006).

Hakonarson H, Thorvaldsson S, Helgadóttir A, Gudbjartsson D, Zink F, Andresdóttir M, Manulescu A, Arnar DO, Andersen K, Sigurdsson A, Thorgeirsson G, Jonsson A, Agnarsson U, Björnsdóttir H, Gottskálsson G, Einarsson A, Gudmundsdóttir H, Adalsteinsdóttir AE, Gudmundsson K, Kristjánsson K, Hardarson T, Kristinsson A, Topol EJ, Gulcher J, Kong A, Gurney M, Thorgeirsson G, Stefánsson K. Effects of a 5-lipoxygenase-activating protein inhibitor on biomarkers associated with risk of myocardial infarction: a randomized trial. *JAMA* **293**: 2245-2256 (2005).

Hammel P, Couvelard A, O'Toole D, Ratouis A, Sauvanet A, Fléjou JF, Degott C, Belghiti J, Benades P, Valla D, Ruszniewski P, Lévy P. Regression of liver fibrosis after biliary drainage in patients with chronic pancreatitis and stenosis of the common bile duct. *N. Engl. J. Med.* **344**: 418-423 (2001).

Harman-Boehm I, Bluher M, Redel H, Sion-Vardy N, Ovadia S, Avinoach E, Shai I, Klötting N, Stumvoll M, Bashan N, Rudich A. Macrophage infiltration into omental versus subcutaneous fat across different populations: effect of regional adiposity and the comorbidities of obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **92**: 2240-2247 (2007).

Hausman GJ, Richardson RL. Adipose tissue angiogenesis. *J. Anim. Sci.* **82**: 925-934 (2004).

He W, Barak Y, Hevener A, Olson P, Liao D, Le J, Nelson M, Ong E, Olefsky JM, Evans RM. Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor gamma knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 15712-15717 (2003).

Heise CE, O'Dowd BF, Figueroa DJ, Sawyer N, Nguyen T, Im DS, Stocco R, Bellefeuille JN, Abramovitz M, Cheng R, Williams DL Jr, Zeng Z, Liu Q, Ma L, Clements MK, Coulombe N, Liu Y, Austin CP, George SR, O'Neill GP, Metters KM, Lynch KR, Evans JF. Characterization of the human cysteinyl leukotriene 2 receptor. *J. Biol. Chem.* **275**: 30531-30536 (2000).

- Helgadottir A, Manolescu A, Thorleifsson G, Gretarsdottir S, Jonsdottir H, Thorsteinsdottir U, Samani NJ, Gudmundsson G, Grant SF, Thorgeisson G, Sveinbjornsdottir S, Valdimarsson EM, Mathiasson SE, Johannsson H, Gudmundsdottir O, Gurney ME, Sainz J, Thorhallsdottir M, Andresdottir M, Frigge ML, Topol EJ, Kong A, Gudnason V, Hakonarson H, Gulcher JR, Stefansson K. The gene encoding 5-lipoxygenase activating protein confers risk of myocardial infarction and stroke. *Nat. Genet.* **36**: 233-239 (2004).
- Henderson WR Jr. The role of leukotrienes in inflammation. *Ann. Intern. Med.* **121**: 684-697 (1994).
- Hicks A, Monkarsh SP, Hoffman AF, Goodnow R Jr. Leukotriene B4 receptor antagonists as therapeutics for inflammatory disease: preclinical and clinical developments. *Expert Opin. Investig. Drugs* **16**: 1909-1920 (2007).
- Higgins DF, Kimura K, Iwano M, Haase VH. Hypoxia inducible factor signaling in the development of tissue fibrosis. *Cell Cycle* **7**: 1128-1132 (2008).
- Hla T, Neilson K. Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 7384-7388 (1992).
- Ho M, Foxall S, Higginbottom M, Donofrio DM, Liao J, Maneuf YP. Leptin-mediated inhibition of the insulin-stimulated increase in fatty acid uptake in differentiated 3T3-L1 adipocytes. *Metabolism*. **55**: 8-12 (2006).
- Hosoi T, Koguchi Y, Sugikawa E, Chikada A, Ogawa K, Tsuda N, Suto N, Tsunoda S, Taniguchi T, Ohnuki T. Identification of a novel human eicosanoid receptor coupled to G(i/o). *J. Biol. Chem.* **277**: 31459-31465 (2002).
- Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* **259**: 87-91 (1993).
- Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. *Science* **271**: 665-668 (1996).
- Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* **444**: 860-867 (2006).
- Houstis N, Rosen ED, Lander ES. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* **440**: 944-948 (2006).

- Hsieh PS, Jin JS, Chiang CF, Chan PC, Chen CH, Shih KC. Cox-2-mediated inflammation in fat is crucial for obesity-linked insulin resistance and fatty liver. *Obesity* **17**: 1150-1157 (2009).
- Huang L, Zhao A, Wong F, Ayala JM, Struthers M, Ujjainwalla F, Wright SD, Springer MS, Evans J, Cui J. Leukotriene B4 strongly increases monocyte chemoattractant protein-1 in human monocytes. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**: 1783-1788 (2004).
- Hui AY, Cheng AS, Chan HL, Go MY, Chan FK, Sakata R, Ueno T, Sata M, Sung JJ. Effect of prostaglandin E2 and prostaglandin I2 on PDGF-induced proliferation of LI90, a human hepatic stellate cell line. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **71**: 329-333 (2004).
- Iredale JP, Benyon R, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S, Hovell C, Arthur MJ. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J. Clin. Invest.* **102**: 538-549 (1998).
- Iredale JP. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J. Clin. Invest.* **117**: 539-548 (2007).
- Jakobsson PJ, Thorén S, Morgenstern R, Samuelsson B. Identification of human prostaglandin R synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 7220-7225 (1999).
- Jensen MD, Haymond MW, Rizza RA, Cryer PE, Miles JM. Influence of body fat distribution on free fatty acid metabolism in obesity. *J. Clin. Invest.* **83**: 1168-1173, (1989).
- Jensen MD. Role of body fat distribution and the metabolic complications of obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **93**: S57-63 (2008).
- Kaaman M, Rydén M, Axelsson T, Nordström E, Sicard A, Bouloumié A, Langin D, Arner P, Dahlman I. ALOX5AP expression, but not gene haplotypes, is associated with obesity and insulin resistance. *Int. J. Obes. (Lond.)* **30**: 447-452 (2006).
- Kamei N, Tobe K, Suzuki R, Ohsugi M, Watanabe T, Kubota N, Ohtsuka-Kowatari N, Kumagai K, Sakamoto K, Kobayashi M, Yamauchi T, Ueki K, Oishi Y, Nishimura S, Manabe I, Hashimoto H, Ohnishi Y, Ogata H, Tokuyama K, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Nagai R, Kadowaki T. Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *J. Biol. Chem.* **281**: 26602-26614 (2006).
- Keaney JF Jr, Larson MG, Vasan RS, Wilson PW, Lipinska I, Corey D, Massaro JM, Sutherland P, Vita JA, Benjamin EJ. Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**: 434-439 (2003).

- Keppler D, Huber M, Baumert T. Leukotrienes as mediators in diseases of the liver. *Semin. Liver Dis.* **8**: 357-366 (1988).
- Kintscher U, Hartge M, Hess K, Foryst-Ludwig A, Clemenz M, Wabitsch M, Fischer-Posovszky P, Barth TF, Dragun D, Skurk T, Hauner H, Blüher M, Unger T, Wolf AM, Knippschild U, Hombach V, Marx N. T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **28**: 1304-1310 (2008).
- Kishi K, Petersen S, Petersen C, Hunter N, Mason K, Masferrer JL, Tofilon PJ, Milas L. Preferential enhancement of tumor radioresponse by a cyclooxygenase-2 inhibitor. *Cancer. Res.* **60**: 1326-1331 (2000).
- Kouzan S, Brody AR, Nettesheim P, Eling T. Production of arachidonic acid metabolites by macrophages exposed in vitro to asbestos, carbonyl iron particles, or calcium ionophore. *Am. Rev. Respir. Dis.* **131**: 624-632 (1985).
- Koza RA, Nikonova L, Hogan J, Rim JS, Mendoza T, Faulk C, Skaf J, Kozak LP. Changes in gene expression foreshadow diet-induced obesity in genetically identical mice. *PLoS Genet.* **2**: e81 (2006).
- Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum BC, Lim RW, Herschman HR. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J. Biol. Chem.* **266**: 12866-12872 (1991).
- Lafontan M, Girard J. Impact of visceral adipose tissue on liver metabolism. Part I: heterogeneity of adipose tissue and functional properties of visceral adipose tissue. *Diabetes Metab.* **34**: 317-327 (2008).
- Laskin DL. Nonparenchymal cells and hepatotoxicity. *Semin. Liver Dis.* **10**: 293-304 (1990).
- Laufer SA, Augustin J, Dannhardt G, Kiefer W. (6,7-Diaryldihydropyrrolizin-5-yl)acetic acids, a novel class of potent dual inhibitors of both cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. *J. Med. Chem.* **37**: 1894-1897 (1994).
- Lewis RA, Austen KF, Soberman RJ. Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. Biochemistry and relation to pathobiology in human diseases. *N. Engl. J. Med.* **323**: 645-655 (1990).
- Liao J, Sportsman R, Harris J, Stahl A. Real-time quantification of fatty acid uptake using a novel fluorescence assay. *J. Lipid Res.* **46**: 597-602 (2005).

Lihn AS, Jessen N, Pedersen SB, Lund S, Richelsen B. AICAR stimulates adiponectin and inhibits cytokines in adipose tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **316**: 853-858 (2004).

Long YC, Zierath JR. AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J. Clin. Invest.* **116**: 1776-1783 (2006).

López-Parra M, Clària J, Titos E, Planagumà A, Parrizas M, Masferrer JL, Jiménez W, Arroyo V, Rivera F, Rodés J. The selective cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib modulates the formation of vasoconstrictor eicosanoids and activates PPARgamma. Influence of albumin. *J. Hepatol.* **42**: 75-81 (2005).

López-Parra M, Titos E, Horrillo R, Ferré N, González-Pérez A, Martínez-Clemente M, Planagumà A, Masferrer JL, Arroyo V, Clària J. Regulatory effects of arachidonate 5-lipoxygenase on hepatic MTP activity and VLDL-TG and ApoB secretion in obese mice. *J. Lipid Res.* **49**: 2513-2523 (2008).

Lotersztajn S, Julien B, Teixeira-Clerc F, Grenard P, Mallat A. Hepatic fibrosis: molecular mechanisms and drug targets. *Annu. Rev. Pharmacol.* **45**: 605-628 (2005).

Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin. Proc.* **55**: 434-438 (1980).

Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J. Clin. Invest.* **117**: 175-184 (2007).

Lumeng CN, DelProposto JB, Westcott DJ, Saltiel AR. Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes. *Diabetes* **57**: 3239-3246 (2008).

Lynch KR, O'Neill GP, Liu Q, Im DS, Sawyer N, Metters KM, Coulombe N, Abramovitz M, Figueroa DJ, Zeng Z, Connolly BM, Bai C, Austin CP, Chateauneuf A, Stocco R, Greig GM, Kargman S, Hooks SB, Hosfield E, Williams DL Jr, Ford-Hutchinson W, Caskey CT, Evans JF. Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor. *Nature* **399**: 789-793 (1999).

Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology* **43**: 31-44 (2006).

Mallat A, Gallois C, Tao J, Habib A, Maclouf J, Mavier P, Préaux AM, Lotersztajn S. Platelet-derived growth factor-BB and thrombin generate positive and negative signals for human

hepatic stellate cell proliferation. Role of a prostaglandin/cyclic AMP pathway and cross-talk with endothelin receptors. *J. Biol. Chem.* **273**: 27300-27305 (1998).

Mancini JA, Abramovitz M, Cox ME, Wong E, Charleson S, Perrier H, Wang Z, Prasit P, Vickers PJ. 5-lipoxygenase activating protein is an arachidonate binding protein. *FEBS Lett.* **318**: 277-281 (1993).

Marchesini G, Moscatiello S, Di Domizio S, Forlani G. Obesity-associated liver disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **93**: S74-S80 (2008).

Marcouiller P, Pelletier JP, Guevremont M, Martel-Pelletier J, Ranger P, Laufer S, Reboul P. Leukotriene and prostaglandin synthesis pathways in osteoarthritic synovial membranes: regulating factors for interleukin 1beta synthesis. *J. Rheumatol.* **32**: 704-712 (2005).

Marra F, DeFranco R, Grappone C, Milani S, Pastacaldi S, Pinzani M, Romanelli RG, Laffi G, Gentilini P. Increased expression of monocyte chemoattractant protein-1 during active hepatic fibrogenesis: correlation with monocyte infiltration. *Am. J. Pathol.* **152**: 423-430 (1998).

Marra F, Efsen E, Romanelli RG, Caligiuri A, Pastacaldi S, Batignani G, Bonacchi A, Caporale R, Laffi G, Pinzani M, Gentilini P. Ligands of peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulate profibrogenic and proinflammatory actions in hepatic stellate cells. *Gastroenterology* **119**: 466-478 (2000).

Marra F, Romanelli RG, Giannini C, Failli P, Pastacaldi S, Arrighi MC, Pinzani M, Laffi G, Montalto P, Gentilini P. Monocyte chemoattractant protein-1 as a chemoattractant for human hepatic stellate cells. *Hepatology* **29**: 140-148 (1999).

Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Reboul P, Pelletier JP. Therapeutic role of dual inhibitors of 5-LOX and COX, selective and non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Ann. Rheum. Dis.* **62**: 501-509 (2003).

Martin V, Ronde P, Unett D, Wong A, Hoffman TL, Edinger AL, Doms RW, Funk CD. Leukotriene binding, signaling, and analysis of HIV coreceptor function in mouse and human leukotriene B4 receptor-transfected cells. *J. Biol. Chem.* **274**: 8597-8603 (1999).

Martínez-Clemente M, Ferré N, González-Pérez A, López-Parra M, Horrillo R, Titos E, Morán-Salvador E, Miquel R, Arroyo V, Clària J. 5-lipoxygenase deficiency reduces hepatic inflammation and tumor necrosis factor alpha-induced hepatocyte damage in hyperlipidemia-prone Apo E-null mice. *Hepatology* **51**: 817-827 (2009).

- Matsuoka M, Tsukamoto H. Stimulation of hepatic lipocyte collagen production by Kupffer cell-derived transforming growth factor beta: implication for a pathogenetic role in alcoholic liver fibrogenesis. *Hepatology* **11**: 599-605 (1990).
- Matsuzawa Y. The metabolic syndrome and adipocytokines. *FEBS Lett.* **580**: 2917-2921 (2006).
- McClain CJ, Barve S, Deaciuc I, Kugelmas M, Hill D. Cytokines in alcoholic liver disease. *Sem. Liver Dis.* **19**: 205-219 (1999).
- Mehrabian M, Allayee H, Stockton J, Lum PY, Drake TA, Castellani LW, Suh M, Armour C, Edwards, Lamb J, Lulis AJ, Schadt EE. Integrating genotypic and expression data in a segregating mouse population to identify 5-lipoxygenase as a susceptibility gene for obesity and bone traits. *Nat. Genet.* **37**: 1224-1233 (2005).
- Mehrabian M, Allayee H, Wong J, Shi W, Wang XP, Shaposhnik Z, Funk CD, Lulis AJ. Identification of 5-lipoxygenase as a major gene contributing to atherosclerosis susceptibility in mice. *Circ. Res.* **91**: 120-126 (2002).
- Mehrabian M, Schulthess FT, Nebohacova M, Castellani LW, Zhou Z, Hartiala J, Oberholzer J, Lulis AJ, Maedler K, Allayee H. Identification of ALOX5 as a gene regulating adiposity and pancreatic function. *Diabetologia* **51**: 978-988 (2008).
- Miller SB. Prostaglandins in health and disease: an overview. *Sem. Arthritis and Rheumatism* **36**: 37-49 (2006).
- Mohammed NA, El Aleem SA, El Hafiz HA, McMahon RF. Distribution of constitutive (COX-1) and inducible (COX-2) cyclooxygenase in postviral human liver cirrhosis: a possible role for COX-2 in the pathogenesis of liver cirrhosis. *J. Clin. Pathol.* **57**: 350-354 (2004).
- Moitra J, Mason MM, Olive M, Krylov D, Gavriloova O, Marcus-Samuels B, Feigenbaum L, Lee E, Aoyama T, Eckhaus M, Reitman ML, Vinson C. Life without white fat: a transgenic mouse. *Genes. Dev.* **12**: 3168-3181 (1998).
- Morita I. Distinct functions of COX-1 and COX-2. *Prostaglandins Other Lipid. Mediat.* **68-69**: 165-175 (2002).
- Muller D, Enderle GJ, Low O, Dietze E, Krell H. Bile ductular proliferation and altered leukotriene elimination in thioacetamide-induced fibrosis of rat liver. *J. Hepatol.* **25**: 547-553 (1996).
- Muller WA. New mechanisms and pathways for monocyte recruitment. *J. Exp. Med.* **194**: F47-51 (2001).

- Munthe-Kaas AC. Phagocytosis in rat Kupffer cells in vitro. *Exp. Cell. Res.* **99**: 319-327 (1976).
- Naito M, Hasegawa G, Ebe Y, Yamamoto T. Differentiation and function of Kupffer cells. *Med. Electron. Microsc.* **37**: 16-28 (2004).
- Nanji AA, Miao L, Thomas P, Rahemtulla A, Khwaja S, Zhao S, Peters D, Tahan SR, Dannenberg AJ. Enhanced cyclooxygenase-2 gene expression in alcoholic liver disease in the rat. *Gastroenterology* **112**: 943-951 (1997a).
- Nanji AA, Zakim D, Rahemtulla A, Daly T, Miao L, Zhao S, Khwaja S, Tahan SR, Dannenberg AJ. Dietary saturated fatty acids down-regulate cyclooxygenase-2 and tumor necrosis factor alpha and reverse fibrosis in alcohol-induced liver disease in the rat. *Hepatology* **26**: 1538-1545 (1997b).
- Narumiya S, FitzGerald GA. Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. *J. Clin. Invest.* **108**: 25-30 (2001).
- Nathan RA, Kemp JP. Efficacy of antileukotriene agents in asthma *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **86**: 9-17 (2001).
- Neels JG, Olefsky JM. Inflamed fat: what starts the fire? *J. Clin. Invest.* **116**: 33-35 (2006).
- Nieman DC, Nehlsen-Cannarella SI, Henson DA, Butterworth DE, Fagoaga OR, Warren BJ, Rainwater MK. Immune response to obesity and moderate weight loss. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **20**: 353-360 (1996).
- Núñez O, Fernández-Martínez A, Majano PL, Apolinario A, Gómez-Gonzalo M, Benedicto I, López-Cabrera M, Boscá L, Clemente G, García-Monzón C, Martín-Sanz P. Increased intrahepatic cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 expression is associated with progressive liver disease in chronic hepatitis C virus infection: role of viral core and NS5A proteins. *Gut* **53**: 1665-1672 (2004).
- Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Goforth MH, Morel CR, Subramanian V, Mukundan L, Red Eagle A, Vats D, Brombacher F, Ferrante AW. Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature* **447**: 1116-1120 (2007).
- Ogston NC, Karastergiou K, Hosseinzadeh-Attar MJ, Bhome R, Madani R, Stables M, Gilroy D, Flachs P, Hensler M, Kopecky J, Mohamed-Ali V. Low-dose acetylsalicylic acid inhibits the secretion of interleukin-6 from white adipose tissue. *Int. J. Obes.* **32**: 1807-1815 (2008).

- Ohki S, Ogino N, Yamamoto S, Hayaishi O. Prostaglandin hydroperoxidase, an integral part of prostaglandin endoperoxidase synthetase from bovine vesicular gland microsomes. *J. Biol. Chem.* **254**: 829-836 (1979).
- Otto JC, Smith WL. Prostaglandin endoperoxide synthase-1 and -2. *J. Lipid. Mediators Cell. Signal.* **12**: 139-156 (1995).
- Peres CM, Aronoff DM, Serezani CH, Flamand N, Faccioli LH, Peters-Golden M. Specific leukotriene receptors couple to distinct G proteins to effect stimulation of alveolar macrophage host defense functions. *J. Immunol.* **179**: 5454-5461 (2007).
- Perreault M, Marette A. Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. *Nat. Med.* **7**: 1138-1143 (2001).
- Pessayre D, Mansouri A, Fromenty B. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis V. Mitochondrial dysfunction in steatohepatitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **282**: G193-199 (2002).
- Pestel S, Jungermann K, Gotze O, Schieferdecker HL. Inhibition by prostaglandin E2 of anaphylatoxin C5a but not zymosan-induced prostanoid release from rat Kupffer cells. *Lab. Invest.* **82**: 463-71 (2002).
- Peters-Golden M, Henderson MW. Leukotrienes. *N. Engl. J. Med.* **357**: 1841-1854 (2007).
- Phan SH, McGarry BM, Loeffler KM, Kunkel SL. Binding of leukotriene C₄ to rat lung fibroblasts and stimulation of collagen synthesis in vitro. *Biochemistry* **27**: 2846-2853 (1988).
- Planagumà A, Clària J, Miquel R, López-Parra M, Titos E, Masferrer JL, Arroyo V, Rodés J. The selective cyclooxygenase-2 inhibitor SC-236 reduces liver fibrosis by mechanisms involving non-parenchymal cell apoptosis and PPARgamma activation. *FASEB J.* **19**: 1120-1122 (2005).
- Planagumà A, Titos E, López-Parra M, Gaya J, Pueyo G, Arroyo V, Clària J. Aspirin (ASA) regulates 5-lipoxygenase activity and peroxisome proliferator-activated receptor alpha-mediated CINC-1 release in rat liver cells: novel actions of lipoxin A4 (LXA4) and ASA-triggered 15-epi-LXA4. *FASEB J.* **16**: 1937-1939 (2002).
- Plante H, Picard S, Mancini J, Borgeat P. 5-Lipoxygenase-activating protein homodimer in human neutrophils: evidence for a role in leukotriene biosynthesis. *Biochem. J.* **393**: 211-218 (2006).

- Powell WS, Rokach J. Biochemistry, biology and chemistry of the 5-lipoxygenase product 5-oxo-ETE. *Prog. Lipid. Res.* **44**:154-183 (2005).
- Puri P, Wiest MW, Cheung O, Mirshahi F, Sargeant C, Min HK, Contos MJ, Sterling RK, Fuchs M, Zhou H, Watkins SM, Sanyal AJ. The plasma lipidomic signature of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* **50**: 1827-1838 (2009).
- Qiu H, Gabrielsen A, Agardh HE, Wan M, Wetterholm A, Wong CH, Hedin U, Swedenborg J, Hansson GK, Samuelsson B, Paulsson-Berne G, Haeggström JZ. Expression of 5-lipoxygenase and leukotriene A4 hydrolase in human atherosclerotic lesions correlates with symptoms of plaque instability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**: 8161-8166 (2006).
- Radmark O, Shimizu T, Jörnvall H, Samuelsson B. Leukotriene A4 hydrolase in human leukocytes. Purification and properties. *J. Biol. Chem.* **259**: 12339-12345 (1984).
- Rakonjac M, Fischer L, Provost P, Wertz O, Steinhilber D, Samuelsson B, Radmark O. Coactosin-like protein supports 5-lipoxygenase enzyme activity and up-regulates leukotriene A4 production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**: 13150-13155 (2006).
- Raynauld JP, Martel-Pelletier J, Bias P, Laufer S, Haraoui B, Choquette D, Beaulieu AD, Abram F, Dorais M, Vignon E, Pelletier JP. Protective effects of licofelone, a 5-lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitor, versus naxopren on cartilage loss in knee osteoarthritis: a first multicentre clinic trial using quantitative MRI. *Ann. Rheum. Dis.* **68**: 938-947 (2009).
- Reding T, Bimmler D, Perren A, Sun L-K, Fortunato F, Storni F, Graf R. A selective COX-2 inhibitor suppresses chronic pancreatitis in an animal model (WBN/Kob rats): significant reduction of macrophage infiltration and fibrosis. *Gut* **55**: 1165-1173 (2006).
- Reed MJ, Meszaros K, Entes LJ, Claypool MD, Pinkett JG, Brignetti D, Luo J, Khandwala A, Reaven GM. Effect of masoprocol on carbohydrate and lipid metabolism in a rat model of Type II diabetes. *Diabetologia* **42**: 102-106 (1999).
- Rieder H, Ramadori G, Allmann KH, Meyer zum Buschenfelde KH. Prostanoid release of cultured liver sinusoidal endothelial cells in response to endotoxin and tumor necrosis factor. Comparison with umbilical vein endothelial cells. *J. Hepatol.* **11**: 359-366 (1990).
- Robertson RP, Gavareski DJ, Porte D Jr, Bierman EL. Inhibition of in vivo insulin secretion by prostaglandin E1. *J. Clin. Invest.* **54**: 310-315 (1974).
- Rocha VZ, Libby P. Obesity, inflammation, and atherosclerosis. *Nat. Rev. Cardiol.* **6**: 399-409 (2009).

Rodés J, Benhamou J-P, Blei A, Reichen J, Rizzetto M, editors. The textbook of hepatology: from basic science to clinical practice. 3rd ed. Malden: Blackwell Publishing. (2007).

Rogoff TM, Lipsky PE. Role of the Kupffer cells in local and systemic immune responses. *Gastroenterology* **80**: 854-860 (1981).

Romano M, Clària J. Cyclooxygenase-2 and 5-Lipoxygenase converging functions on cell proliferation and tumor angiogenesis: Implications for cancer therapy. *FASEB J.* **17**: 1986-1995 (2003).

Rouzer CA, Matsumoto T, Samuelsson B. Single protein from human leukocytes possesses 5-lipoxygenase and leukotriene A4 synthase activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 857-861 (1986).

Rupnick MA, Panigrahy D, Zhang CY, Dallabrida SM, Lowell BB, Langer R, Folkman MJ. Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 10730-10735 (2002).

Samad F, Yamamoto K, Loskutoff DJ. Distribution and regulation of plasminogen activator inhibitor-1 in murine adipose tissue in vivo. Induction by tumor necrosis factor alpha and lipopolysaccharide. *J. Clin. Invest.* **97**: 37-46 (1996).

Samad F, Yamamoto K, Pandey M, Loskutoff DJ. Elevated expression of transforming growth factor-beta in adipose tissue from obese mice. *Mol. Med.* **3**: 37-48 (1997).

Samuelsson B, Dahlen SE, Lindgren JA, Rouzer CA, Serhan CN. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science* **237**: 1171-1176 (1987).

Samuelsson B. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* **220**: 568-575 (1983).

Sánchez-Galán E, Gómez-Hernández A, Vidal C, Martín-Ventura JL, Blanco-Colio LM, Muñoz-García B, Ortega L, Egido J, Tuñón J. Leukotriene B4 enhances the activity of nuclear factor-kappaB pathway through BLT1 and BLT2 receptors in atherosclerosis. *Cardiovasc. Res.* **81**: 216-225 (2009).

Sanyal AJ. Mechanisms of disease: pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* **2**: 46-53 (2005).

Sartipy P, Loskutoff DJ. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 7265-7270 (2003).

- Schwieterman W, Sorrentino D, Potter BJ, Rand J, Kiang CL, Stump D, Berk PD. Uptake of oleate by isolated rat adipocytes is mediated by a 40-kDa plasma membrane fatty acid binding protein closely related to that in liver and gut. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 359-363 (1988).
- Serhan CN. Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin biosynthesis: an update and role in anti-inflammation and pro-resolution. *Prostaglandins Other Lipid. Mediat.* **68-69**: 433-455 (2002).
- Shanmugam N, Kim YS, Lanting L, Natarajan R. Regulation of cyclooxygenase-2 expression in monocytes by ligation of the receptor for advanced glycation end products *J. Biol. Chem.* **278**: 34834-34844 (2003).
- Shi Y, Buru P. Lipid metabolic enzymes: emerging targets for the treatment of obesity. *Nature Reviews Drug Discovery* **3**: 695-710 (2004).
- Shimada K, Navarro J, Goeger DE, Mustafa SB, Weigel PH, Weinman SA. Expression and regulation of leukotriene-synthesis enzymes in rat liver cells. *Hepatology* **28**: 1275-1281 (1998).
- Shimizu T, Radmark O, Samuelsson B. Enzyme with dual lipoxygenase activities catalyzes leukotriene A4 synthesis from arachidonic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 689-693 (1984).
- Shiratori Y, Geerts A, Ichida T, Kawase T, Wisse E. Kupffer cells from CCl₄-induced fibrotic livers stimulate proliferation of fat-storing cells. *J. Hepatol.* **3**: 294-303 (1986).
- Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **116**: 1793-1801 (2006).
- Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **106**: 171-176 (2000).
- Sipe JD, Bartle LM, Loose LD. Modification of proinflammatory cytokine production by the antirheumatic agents tenidap and naproxen. A possible correlate with clinical acute phase response. *J. Immunol.* **148**: 480-484 (1992).
- Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu. Rev. Biochem.* **69**: 145-182 (2000).
- Smith WL, Song I. The enzymology of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Prostaglandins Other Lipid. Mediat.* **68-69**: 115-128 (2002).
- Solinas G, Vilcu C, Neels JG, Bandyopadhyay GK, Luo JL, Naugler W, Grivennikov S, Wynshaw-Boris A, Scadeng M, Olefsky JM. JNK1 in hematopoietically derived cells contributes to diet-

induced inflammation and insulin resistance without affecting obesity. *Cell. Metab.* **6**: 386-397 (2007).

Song MJ, Kim KH, Yoon JM, Kim JB. Activation of Toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **346**: 739-745 (2006).

Sorensen TI, Orholm M, Bentsen KD, Hoybye G, Eghoje K, Christoffersen P. Prospective evaluation of alcohol abuse and alcoholic liver injury in men as predictors of development of cirrhosis. *Lancet* **2**: 241-244 (1984).

Spanbroek R, Grabner R, Lotzer K, Hildner M, Urbach A, Ruhling K, Moos MP, Kaiser B, Cohnert TU, Wahlers T, Zieske A, Plenz G, Robenek H, Salbach P, Kuhn H, Radmark O, Samuelsson B, Habenicht AJ. Expanding expression of the 5-lipoxygenase pathway within the arterial wall during human atherogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 1238-1243 (2003).

Straus DS, Glass CK. Cyclopentenone prostaglandins: new insights on biological activities and cellular targets. *Med. Res. Rev.* **21**: 185-210 (2001).

Sun B, Karin M. 2008. NF-kappaB signaling, liver disease and hepatoprotective agents. *Oncogene* **20**: 6228:6244 (2008).

Takahashi K, Mizuarai S, Araki H, Mashiko S, Ishihara A, Kanatani A, Itadani H, Kotani H. Adiposity elevates plasma MCP-1 levels leading to the increased CD11b-positive monocytes in mice. *J. Biol. Chem.* **278**: 46654-46660 (2003).

Thun MJ, Henley SJ, Patrono C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *J. Natl. Cancer. Inst.* **94**: 252-266 (2002).

Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **6**: 772-783 (2006).

Titos E, Clària J, Bataller R, Bosch-Marcé M, Ginès P, Jiménez W, Arroyo V, Rivera F, Rodés J. Hepatocyte-derived cysteinyl leukotrienes modulate vascular tone in experimental cirrhosis. *Gastroenterology* **119**: 794-805 (2000).

Titos E, Clària J, Planagumà A, López-Parra M, González-Pérez A, Gaya J, Miquel R, Arroyo V, Rodés J. Inhibition of 5-lipoxygenase-activating protein abrogates experimental liver injury: role of Kupffer cells. *J. Leukoc. Biol.* **78**: 871-874 (2005).

Titos E, Clària J, Planagumà A, López-Parra M, Villamor N, Párrizas M, Carrió A, Miquel R, Jiménez W, Arroyo V, Rivera F, Rodés J. Inhibition of 5-lipoxygenase induces cell growth arrest

and apoptosis in rat Kupffer cells: implications for liver fibrosis. *FASEB J.* **17**: 1745-1747 (2003).

Tsukamoto H, Matsuoka M, French SW. Experimental models of hepatic fibrosis: a review. *Semin. Liver Dis.* **10**: 56-65 (1990).

Uemura M, Buchholz U, Kojima H, Keppler A, Hafkemeyer P, Fukui H, Tsujii T, Kepper D. Cysteinyl leukotrienes in the urine of patients with liver diseases. *Hepatology* **20**: 804-812 (1994).

Van Bossuyt H, Wisse E. Cultured Kupffer cells, isolated from human and rat liver biopsies, ingest endotoxin. *J. Hepatol.* **7**: 45-56 (1988).

van der Poorten D, Milner KL, Hui J, Hodge A, Trenell MI, Kench JG, London R, Peduto T, Chisholm DJ, George J. Visceral fat: a key mediator of steatohepatitis in metabolic liver disease. *Hepatology* **48**: 449-457 (2008).

van Kruijsdijk RCM, van der Wall E, Visseren FLJ. Obesity and Cancer: The Role of Dysfunctional Adipose Tissue. *Cancer. Epidemiol. Biomarkers Prev.* **18**: 2569-2578 (2009).

Vane JR, Botting RM. Antiinflammatory drugs and their mechanism of action. *Inflamm. Res.* **2**: S78-87 (1998).

Vgontzas AN, Papanicolaou DA, Bixler EO, Kales A, Tyson K, Chrousos GP. Elevation of plasma cytokines in disorders of excessive daytime sleepiness: role of sleep disturbance and obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82**: 1313-1316 (1997).

Vidal C, Gómez-Hernández A, Sánchez-Galán E, González A, Ortega L, Gómez-Gerique JA, Tunon J, Egido J. Licofelone, a balanced inhibitor of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase, reduces inflammation in a rabbit model of atherosclerosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **320**: 108-116 (2007).

Visser M, Bouter LM, McQuillan GM, Wener MH, Harris TB. Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *JAMA* **282**: 2131-2135 (1999).

Wallace JL, Carter J, McKinght W, Tries S, Laufer SA. ML 3000 reduces gastric prostaglandin synthesis without causing mucosal injury. *Eur. J. Pharmacol.* **271**: 525-531 (1994).

Wang B, Wood IS, Trayhurn P. Dysregulation of the expression and secretion of inflammation-related adipokines by hypoxia in human adipocytes. *Pflugers. Arch.* **455**: 479-492 (2007).

- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* **112**: 1796-1808 (2003).
- Weisberg SP, Hunter R, Huber R, Menieux 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.* **116**: 115-124 (2006).
- Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, diabetes. *J. Clin. Invest.* **115**: 1111-1119 (2005).
- Winwood PJ, Arthur MJ. Kupffer cells: their activation and role in animal models of liver injury and human liver disease. *Semin. Liver. Dis.* **13**: 50-59 (1993).
- Wisse E. Observations on the fine structure and peroxidase cytochemistry of normal rat liver Kupffer cells. *J. Ultrastruct. Res.* **46**: 393-426 (1974).
- Womack J, Tien PC, Feldman J, Shin JH, Fennie K, Anastos K, Cohen MH, Bacon MC, Minkoff H. Obesity and immune cell counts in women. *Metabolism* **56**: 998-1004 (2007).
- Woods JW, Evans JF, Ethier E, Scott S, Vickers PJ, Heran L, Heibein JA, Charleson S, Singer II. 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase activating protein are localized in the nuclear envelope of activated human leukocytes. *J. Exp. Med.* **178**: 1935-1946 (1993).
- Xie W, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL, Simmons DL. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 2692-2696 (1991).
- Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity related insuline resistance. *J. Clin. Invest.* **112**: 1821-1830 (2003).
- Yamamoto H, Kondo M, Nakamori S, Nagano H, Wakasa K, Sugita Y, Chang-De J, Kobayashi S, Damdinsuren B, Dono K, Umeshita K, Sekimoto M, Sakon M, Matura N, Monden M. JTE-522, a cyclooxygenase-2 inhibitor, is an effective chemopreventive agent against rat experimental liver fibrosis. *Gastroenterology* **125**: 556-571 (2003).
- Ye J, Gao Z, Yin J, He Q. Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **293**: 1118-1128 (2007).

Yokomizo T, Izumi T, Chang K, Takawa Y, Shimizu T. A G-protein-coupled receptor for leukotriene B4 that mediates chemotaxis. *Nature* **387**: 620-624 (1997).

Yokomizo T, Kato K, Terawaki K, Izumi T, Shimizu T. A second leukotriene B4 receptor, BLT2. A new therapeutic target in inflammation and immunological disorders. *J. Exp. Med.* **192**: 421-432 (2000).

Yu J, Hui AY, Chu ES, Cheng AS, Go MY, Chan HL, Leung WK, Cheung KF, Ching AK, Chui YL, Chan KK, Sung JJ. Expression of a Cox-2 Transgene in Murine Liver Causes Hepatitis. *Gut* **56**: 991-999 (2007).

Yu J, Ip E, Dela Peña A, Hou JY, Sessa J, Pera N, Hall P, Kirsch R, Leclercq I, Farrell GC. COX-2 induction in mice with experimental nutritional steatohepatitis: Role as proinflammatory mediator. *Hepatology* **43**: 826-836 (2006).

Zeyda M, Farmer D, Todoric J, Aszmann O, Speiser M, Gyori G, Zlabinger GJ, Stulnig TM. Human adipose tissue macrophages are of an anti-inflammatory phenotype but capable of excessive pro-inflammatory mediator production. *Int. J. Obes.* **31**: 1420-1428 (2007).

Zhao L, Moos MP, Gräbner R, Pédrone F, Fan J, Kaiser B, John N, Schmidt S, Spanbroek R, Lötzer K, Huang L, Cui J, Rader DJ, Evans JF, Habenicht AJ, Funk CD. The 5-lipoxygenase pathway promotes pathogenesis of hyperlipidemia-dependent aortic aneurysm. *Nat. Med.* **10**: 966-973 (2004).

*ANNEX I:
Material i mètodes*

I-ESTUDIS *IN VIVO*

Durant la realització d'aquesta tesi s'ha treballat amb models experimentals de dany hepàtic i obesitat. Tots els estudis animals van ser realitzats seguint els criteris del Comitè d'Ètica i Investigació de l'Hospital Clínic i les lleis sobre l'ús d'animals d'experimentació de la Comunitat Europea.

1) Model de inducció de inflamació i fibrosi hepàtica amb CCl₄

El dany hepàtic a ratolins es va provocar mitjançant l'administració de l'hepatotòxic CCl₄ (Clària i Jiménez, 1999) amb modificacions. Els animals van rebre injeccions intraperitoneals de CCl₄ dos cops per setmana durant vuit setmanes. El CCl₄ va ser administrat als animals amb una dosi de 1 ml/kg pes corporal diluït en oli d'oliva (1/8).

2) Model de inducció a obesitat i esteatosi hepàtica amb dieta rica en greix

Per poder provocar la obesitat i les patologies associades a l'obesitat, els ratolins van ser alimentats amb una dieta rica en greix durant 16 setmanes. Aquesta dieta de Harland Tekland conté un 22.7% de greix (9.5% llard i 5% oli de soja; 45% kcal procedents del greix), quantitat molt superior a la dieta estàndard de ratolí (7.2% de greix i 11% kcal procedents del greix).

3) Administració de fàrmacs

SC-236

L'inhibidor selectiu de la COX-2, SC-236, va ser administrat amb l'aigua de beguda en una dosi de 6 mg/kg pes corporal (Kishi *et al.*, 2000) durant 9 setmanes. Per aconseguir aquesta

dosi, es va dissoldre el SC-236 en una solució mare (5% Tween-20 i 95% polietilenglicol) i es va diluir en aigua mineral fins assolir una concentració de 0.045 mg/ml. Els ratolins (amb pes corporal ~ 30 g) beuen aproximadament 4 ml/dia d'aquesta solució diluïda. Cada tres dies la solució mare de SC-236 es preparava nova i es canviaven les ampolles d'aigua.

CJ-13,610

L'inhibidor selectiu de la 5-LO de tipus no-redox, CJ-13,610, va ser administrat amb la dieta amb una dosi de 10 mg/kg pes corporal durant 9 setmanes. PMI Nutrition International va preparar la dieta amb CJ-13,610. Els ratolins (amb pes corporal ~ 30 g) mengen uns 2.5 g al dia. La dieta es guardava en fred i fosc, i es canviava dos cops a la setmana.

Bay-X-1005

L'inhibidor selectiu de la FLAP, Bay-X-1005, va ser administrat als ratolins per via oral amb una dosi de 100 mg/kg pes corporal durant 4 setmanes (Titos *et al.*, 2005). Per aconseguir aquesta dosi, el Bay-X-1005 es va dissoldre en carboximetilcel·lulosa (0.05%) fins assolir una concentració de 15 mg/ml. La solució es va administrar diàriament als ratolins mitjançant una cànula de via oral (150 µl/kg pes corporal).

Els compostos administrats *in vivo* es detallen a la taula 7 (VIII-Materials).

4) Estudis experimentals

Estudi A

Ratolins mascles 129S2/SvPasCrl es van distribuir aleatòriament en quatre grups diferents que van rebre placebo (grup placebo, n=9), l'inhibidor de la COX-2, SC-236, (grup SC, n=9),

l'inhibidor de la 5-LO, CJ-13,610, (grup CJ, n=9) o una combinació dels dos inhibidors (grup SC+CJ, n=9). Després d'una setmana d'administració dels compostos, els ratolins van començar amb el protocol d'inducció a dany hepàtic durant 8 setmanes.

Estudi B

Ratolins mascles salvatges (129S2/SvPasCrl) i ratolins deficients per a la 5-LO (129-*Alox5tm1Fun*, *n*₁₅, The Jackson Laboratory) es van dividir en quatre grups d'estudi: ratolins salvatge rebent placebo (n=5), ratolins salvatges rebent SC-236 (n=5), ratolins deficients per la 5-LO rebent placebo (n=5) i ratolins deficients per la 5-LO rebent SC-236 (n=5). Després d'una setmana d'administració, els ratolins van començar amb el protocol d'inducció a dany hepàtic durant 6 setmanes.

Estudi C

En aquest estudi es van fer servir ratolins mascles salvatges C57/BL6 i ratolins genèticament obesos *ob/ob* (B6.V-Lep_{ob}/J, The Jackson Laboratory) alimentats amb una dieta estàndard.

Estudi D

Ratolins mascles C57/BL6 induïts a obesitat mitjançant una dieta rica en greix durant 12 setmanes es van distribuir aleatòriament en dos grups diferents que van rebre diàriament placebo (grup placebo, n=10), o l'inhibidor de la FLAP, Bay-X-1005, (grup Bay-X-1005, n=10) durant quatre setmanes. Durant el període d'administració dels compostos els ratolins van continuar l'alimentació amb la dieta grassa.

5) Test de tolerància a la glucosa

Per realitzar el test de tolerància a la glucosa, els ratolins de l'estudi D van estar en dejú durant tota la nit. El temps zero es va comptabilitzar quan els ratolins van rebre una injecció intraperitoneal de glucosa (2 g glucosa/kg pes corporal, en una solució al 20% en sèrum fisiològic). Les mostres de sang es van recollir a través de la cua a diferents temps: 0 (recollit abans de l'administració de glucosa), 15, 22.5, 30, 45, 60, 90 i 120 minuts. En aquests temps les determinacions de glucosa es va fer mitjançant el sistema Accu-Chek Aviva (Roche diagnostics).

6) Test de sensibilitat a la insulina

Per realitzar el test de sensibilitat a la insulina, els ratolins de l'estudi D van estar en dejú durant 2 hores. El temps zero es va comptabilitzar quan els ratolins van rebre una injecció intraperitoneal de insulina recombinant (0.75 U/kg pes corporal, en una dilució 1/1500). Les mostres de sang es van recollir a través de la cua a diferents temps: 0 (recollit abans de l'administració d'insulina), 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 i 120 minuts. En aquests temps la determinació de glucosa es va fer mitjançant el sistema Accu-Chek Aviva (Roche diagnostics).

II-ESTUDIS *IN VITRO*

Durant la realització d'aquesta tesi s'ha treballat amb macròfags de la línia murina RAW264.7 i amb adipòcits diferenciats de la línia 3T3-L1, tots ells procedents de la *European Collection of Cell Cultures*. A més d'adipòcits primaris aïllats de teixit adipós epididimari de ratolí. Els compostos utilitzats en aquests experiments es detallen a la taula 7 (VIII-Materials).

1) Experiments *ex vivo* amb explants de teixit adipós

Els explants es van obtenir de teixit adipós blanc epididimari procedent de ratolins seguint el següent procediment:

- 1) Extraure el teixit adipós epididimari del ratolí anestesiàt (0.1 mg ketamina/g pes corporal i 0.01 mg xilacina/g pes corporal, intraperitoneal).
- 2) Posar-lo en una placa P60 amb PBS (amb 1% penicil·lina/estreptomicina a 37°C).
- 3) Sota condicions estèrils, disseccionar els explants per eliminar el teixit connectiu i els vasos sanguinis.
- 4) Tallar els explants en trossos (<10 mg), posar-los en un tub de 50 ml amb PBS i centrifugar-los (1 minut, 400 *g*) per eliminar les cèl·lules sanguínies i els trossos de teixit que no tenen prou adipòcits per flotar.
- 5) Pesar els explants, posar-los en medi de cultiu (taula 9, VIII-Materials) i incubar-los a 37°C i 5% CO₂ segons les condicions desitjades.

1.1) Incubacions d'explants

Incubació A

Per avaluar la lipòlisi al teixit adipós, es va utilitzar l'isoproterenol, un anàleg de les

catecolamines que indueix l'alliberament d'àcids grassos. Els explants es van cultivar en plaques de 12 pous (40 mg/pou) durant 1 hora amb les següents condicions:

- Vehicle (<0.1% DMSO)
- Isoproterenol (10 μ M)
- Isoproterenol (10 μ M) + inhibidor de la 5-LO (1 μ M)

Els nivells d'àcids grassos lliures als sobrenedants es van determinar amb el NEFA-C kit (Wako Pure Chemicals).

Incubació B

Per avaluar l'activitat NF- κ B en extractes nuclears del teixit adipós, els explants es van cultivar en plaques de 6 pous (200 mg/pou) durant 2 hores amb les següents condicions:

- Vehicle (<0.5% EtOH)
- LTB₄ (1, 10 i 100 nM)
- LTD₄ (1, 10 i 100 nM)

Incubació C

Per avaluar els nivells de citoquines secretades per el teixit adipós, els explants es van cultivar en plaques de 12 pous (40 mg/pou) durant 24 hores amb les següents condicions:

- Vehicle (<0.5% EtOH)
- LTB₄ (1, 10 i 100 nM)
- LTD₄ (1, 10 i 100 nM)
- Bay-X-1005 (30 μ M)

Els nivells de TNF α , IL-6 i MCP-1 als sobrenedants es van determinar mitjançant kits ELISA de R&D Systems.

Incubació D

Per perfilar els eicosanoids produïts per el teixit adipós, els explants de ratolins *ob/ob* es van incubar durant 90 minuts amb 5 ml de tampó Ringer amb àcid araquidònic (50 μ M) i ionòfor A23187 (5 μ M). Els eicosanoids es van extreure del teixit adipós i es van analitzar mitjançant HPLC.

Incubació E

Per veure el perfil de citoquines secretades per el teixit adipós es va utilitzar el "RayBio Mouse Inflammation Antibody Array 1" (RayBiotech), el qual permet la detecció simultània de 40 adipoquines, citoquines i quimioquines diferents relacionades amb la inflamació. Per tant, els explants es van cultivar en plaques de 6 pous (200 mg/pou) durant 24 hores amb les següents condicions:

- Vehicle (<0.5% EtOH)
- LTB₄ (1 μ M)
- LTB₄ (1 μ M) + U-75302 (1 μ M, 10 minuts abans)

Al final de la incubació, els sobrenedants es van recollir, suplementar amb inhibidors de proteases i congelar a -80°C fins a realitzar l'*array* de citoquines. La membrana recoberta d'anticossos es va incubar amb 1 ml de sobrenedant seguint les instruccions del fabricant. Els senyals es van obtenir amb quimioluminiscència i la seva intensitat es va quantificar mitjançant densitometria. Els controls positius incorporats a cada membrana van servir per normalitzar els resultats entre diferents experiments.

2) Aïllaments d'adipòcits i cèl·lules vasculars de l'estroma (SVC)

Els adipòcits i les SVC es van aïllar de teixit adipós epididimari de ratolins C57/BL6 segons

el següent procediment:

- 1) Extraure el teixit adipós epididimari i posar-lo en una placa P60 amb medi KR (taula 9, VIII-Materials).
- 2) Sota condicions estèrils, rentar el teixit i tallar-lo en trossos petits.
- 3) Centrifugar a 500 *g* durant 5 minuts per eliminar els eritròcits i altres cèl·lules sanguínies.
- 4) Digerir el teixit amb 5 ml de medi KR suplementat amb col·lagenasa (1 mg/ml, Roche) i BSA (2%) durant 20 minuts al bany a 37°C amb agitació (60 revolucions/minut).
- 5) Filtrar la suspensió a través d'una malla de niló de 100 µm sobre un falcon de 50 ml, afegir medi KR i centrifugar (500 *g*, 5 minuts).
- 6) Transvasar les cèl·lules flotants (adipòcits) a un altre tub i rentar-les amb medi d'adipòcits aïllats (taula 9, VIII-Materials).
- 7) Incubar les cèl·lules sedimentades (SVC) amb tampó de lisi d'eritròcits (taula 8, VIII-Materials) durant 5 minuts, centrifugar-les i extraure el RNA amb trizol.
- 8) Incubar els adipòcits amb medi d'adipòcits les condicions desitjades a 37°C i un 5% CO₂.

2.1) Assaig d'entrada d'àcids grassos en adipòcits aïllats

L'entrada d'àcids grassos a l'interior dels adipòcits primaris va ser avaluada per dos mètodes diferents. Utilitzant un àcid gras unit a una molècula fluorescent (àcid dodecanoic-BODIPY) o marcat amb radioactivitat (àcid oleic [9,10-³H(N)]).

2.1.1 Assaig fluorescent (QBT Fatty acid uptake)

Es va utilitzar el "QBT Fatty Acid Uptake Assay Kit" (Molecular Devices) seguint les

instruccions del fabricant. Aquest kit utilitza un anàleg fluorescent, l'àcid dodecanoic unit a BODIPY que resta desactivat fins que la cèl·lula l'internalitza. Aquest anàleg és un substrat per als transportadors d'àcids grassos ja que competeix amb àcids grassos no marcats (Ho *et al.*, 2006; Liao *et al.*, 2005). Per realitzar l'assaig es va seguir el següent procediment:

- 1) Plaquejar 50,000 cèl·lules/pou a les plaques per fluorescència en 90 ml de medi d'adipòcits sense sèrum (amb 0.2% de BSA lliure d'àcids grassos).
- 2) Realitzar les incubacions:
 - Vehicle
 - LTB₄ (0.1 μM)
 - LTB₄ (0.1 μM) + U-75302 (1 μM, 10 minuts abans)
 - LTD₄ (0.1 μM)
 - LTD₄ (0.1 μM) + MK-571 (1 μM, 10 minuts abans)
- 3) Després de 30 minuts, afegir 100 μl per pou de 1x *Loading buffer* (preparat segons les instruccions del kit).
- 4) Llegir immediatament en un espectrofotòmetre de fluorescència per plaques amb $\lambda_{exc}=450$ nm i $\lambda_{em}=520$ nm cada 20 segons durant 60 minuts.

2.1.2 Assaig radioactiu

Per avaluar l'entrada d'àcids grassos als adipòcits mitjançant un mètode radioactiu es va utilitzar un àcid oleic tritiat i el mètode de la filtració ràpida (Berk *et al.*, 1999; Schwieterman *et al.*, 1988) segons el protocol:

- 1) Incubar 50,000 cèl·lules/tub en tubs de 15 ml amb 1 ml de medi d'adipòcits sense sèrum (amb un 2% de BSA lliure d'àcids grassos).
- 2) Afegir els compostos desitjats.
- 3) Incubar amb les cèl·lules amb diferents concentracions de [³H]-àcid oleic (àcid oleic-BSA

ràtios 0.25:1 i 2:1) durant 30 segons, 5 minuts o 30 minuts a 37°C.

Àcid oleic [9,10-3H(N)] (Perkin Elmer, 1 mCi)

a. Ràtio Àcid oleic:BSA=0.25 72.115 µM Oleic, 5 µCi/ml

b. Ràtio Àcid oleic:BSA=2.0 576.92 µM Oleic, 5 µCi/ml

- 4) A diferents temps, parar la reacció amb 5 ml de solució de parada (400 µM floretina, 0.1% de BSA) a 4°C i posar els tubs amb gel.
- 5) Filtrar les cèl·lules al buit mitjançant un filtre Whatman.
- 6) Rentar els filtres amb 10 ml de PBS a 4°C i deixar-los assecar.
- 7) Posar els filtres dintre de vials amb líquid de centelleig.
- 8) Comptar la radioactivitat a l'interior de les cèl·lules amb un comptador de centelleig.

3) Experiments amb adipòcits diferenciats 3T3-L1

Les cèl·lules de la línia 3T3-L1 són fibroblastes de ratolí que es poden diferenciar a adipòcits amb un còctel hormonal (la composició dels medis utilitzats es troba a la taula 9, VIII-Materials). Les cèl·lules 3T3-L1 es mantenen en medi de fibroblastes canviant el medi cada 3 dies i passant-les quan arriben a un 70% de confluència. Per diferenciar aquestes cèl·lules a adipòcits es plaquegen en plaques de 12 pous (150,000 cèl·lules/pou) dos dies després d'estar confluents i es deixen créixer durant dos dies més. A continuació, es procedeix a la diferenciació mitjançant diferents medis: medi d'inducció (2 dies), medi de manteniment (3 dies) i medi d'adipòcits (2 dies). Seguint aquest procediment, després de 8 dies de començar amb la diferenciació, al menys el 80% de les cèl·lules exhibeixen un fenotip d'adipòcits amb una acumulació evident de gotes lipídiques.

Per avaluar l'expressió gènica, vam incubar els adipòcits amb IL-1β (10 ng/ml, Peprotech) i els següents compostos durant 24 hores a 37°C:

- Vehicle (<0.1% DMSO)
- Bay-X-1005 (30 μ M)
- U-75302 (1 μ M)
- MK-571 (1 μ M)

Un cop acabades les incubacions el RNA es va extreure amb el kit RNAqueous.

4) Experiments amb macròfags Raw 264.7

Les cèl·lules Raw 264.7 es van cultivar en flascons de 150 cm² (6·10⁶ cèl·lules/flascó) sota atmosfera humida amb 5% CO₂ a 37°C. Les cèl·lules es van plaquejar en medi Raw (taula 9, VIII-Materials) durant 16 hores abans de procedir amb les incubacions.

4.1) Incubacions amb Raw 264.7

Incubació A

Per avaluar els efectes a la biosíntesi de PGE₂, el macròfags es van cultivar en plaques de 12 pous (200,000 cèl·lules/pou) amb medi Raw sense sèrum i es van estimular amb LPS (500 ng/ml) durant 24 hores per induir l'expressió de COX-2 (Barrios-Rodiles *et al.*, 1999). Un cop rentades, les cèl·lules es van incubar durant 15 minuts amb:

- Vehicle (<0.1% DMSO)
- SC-236 (0.1, 1, 10 μ M)
- CJ-13,610 (1 μ M) + SC-236 (3 μ M)
- Licofelone (1, 10, 30 μ M)

A continuació es van estimular amb ionòfor A23187 (5 μ M) durant 15 minuts més per estimular la producció dels metabolits de l'àcid araquidònic (Kouzan *et al.*, 1985). Un cop acabades les incubacions, es van afegir dos volums de MeOH al sobrenadant. Es van

centrifugar, evaporar sota corrent de N₂ i guardar a -80°C fins a la determinació d'eicosanoids mitjançant EIA.

Incubació B

Per avaluar els efectes en la biosíntesi de LTB₄, els macròfags es van cultivar en plaques de 12 pous (200,000 cèl·lules/pou) en medi Raw sense sèrum durant 15 minuts amb les següents condicions:

- Vehicle (<0.1% DMSO)
- CJ-13,610 (0.1, 1 i 10 µM)
- AA-861 (1, 10 i 15 µM)
- CJ-13,610 (1 µM) + SC-236 (1 µM)
- AA-861 (10 µM) + SC-236 (1 µM)
- Licofelone (1, 10 i 30 µM)

A continuació es van estimular amb ionòfor A23187 (5 µM) durant 15 minuts i els sobrenedants es van tractar com a la incubació A.

Incubació C

Per avaluar l'expressió gènica, els macròfags es van cultivar en plaques de 6 pous (500,000 cèl·lules/pou) en medi Raw sense sèrum durant 2 hores amb les següents condicions:

- Vehicle (<0.1% DMSO)
- SC-236 (3 µM)
- CJ-13,610 (1 µM)
- AA-861 (10 µM)
- CJ-13,610 (1 µM) + SC-236 (3 µM)
- AA-861 (10 µM) + SC-236 (3 µM)
- Licofelone (30 µM)
- CP-105,696 (0.1 µM)

- MK-571 (1 μ M)

A continuació es van estimular amb PMA (50 nM) i ionòfor A23187 (2 μ M) durant 4 hores més. Un cop acabades les incubacions el RNA es va extreure amb el kit RNAqueous (Ambion).

4.2) Assaig de viabilitat cel·lular

Per avaluar la viabilitat de les cèl·lules en contacte amb els compostos usats es va mesurar la proliferació cel·lular segons la capacitat de les cèl·lules de reduir les sals de tetraazoli. Si una cèl·lula és metabòlicament activa les seves deshidrogenases podran reduir el Bromur de 3-(4,5)-dimetiltiazolil-2,5-difeniltetraazoli (MTT). Es va seguir el següent protocol:

- 1) Plaquejar les cèl·lules Raw 264.7 en plaques de 24 pous (100.0000/pou) en medi sense sèrum un dia abans de començar l'experiment.
- 2) El mateix dia plaquejar una corba patró de cèl·lules.
- 3) Incubar les cèl·lules amb els compostos durant 1 hora.
- 4) Afegir 100 μ l de MTT (5 mg/ml).
- 5) Incubar 3 hores protegit de la llum.
- 6) Parar la reacció amb 1 ml d'isopropanol.
- 7) Agitar 20 minuts a alta velocitat per dissoldre els cristalls.
- 8) Transvasar 200 μ l de cada un dels pous de la placa de 24 a un pou d'una placa de 96.
- 9) Seguidament llegir l'absorbància a l'espectre a $\lambda=570$ nm i calcular la viabilitat de les cèl·lules a partir de la corba patró.

4.3) Protocol per al comptatge de cèl·lules viables

Posar en un eppendorf: 10 µl solució cel·lular

90 µl Tripan Blue

100 µl Tampó de contactge (0.5% d'àcid acètic en salí)

Mesclar bé, esperar uns minuts i posar 10 µl entre el cobreobjectes i la cambra de Neubauer. Contar les cèl·lules que no hagin internalitzat el Tripan Blue.

$$(N^{\circ} \text{ cèl·lules}/4) \times 20 \times 10^4 = \text{cèl·lules/ml}$$

III-TÈCNIQUES HISTOLÒGIQUES

Les mostres histològiques de fetge i teixit adipós procedeixen del diferents estudis *in vivo* realitzats amb ratolins. El teixit adipós epididimari i el fetge s'extrauen, es netegen amb PBS, es fixen amb formol al 10% i s'inclouen en parafina.

Les incubacions a les tècniques histològiques es realitzen en cambra humida i els rentats en cubetes tipus *copplin*. No s'han de deixar assecar mai les seccions i durant les incubacions llargues s'ha de posar una mica de parafilm a sobre per evitar l'evaporació.

1) Determinació de la fibrosi hepàtica amb tinció Sirius Red

Per realitzar la tinció amb Sirius Red, s'utilitzen seccions de fetge preservades amb parafina. Les seccions (5 µm) es tenyeixen amb el següent procediment:

- 1) Desparafinar i hidratar les seccions: 10 minuts xilè (1), 5 minuts xilè (2), 5 minuts EtOH 100% (1), 5 minuts EtOH 100% (2), 5 minuts EtOH 70% (1), 5 minuts EtOH 70% (2), 5 minuts EtOH 50% i 5 minuts H₂O.
- 2) Incubar amb tiosemicarbazida (0.5%) durant 10 minuts.
- 3) Tenyir amb la solució de Sirius Red (0.1% de Sirius Red F3B en una solució saturada d'àcid pícric) durant 1 hora.
- 4) Rentar amb una solució d'àcid acètic (0.5%).
- 5) Deshidratar ràpidament: EtOH (70%), EtOH (100%) i xilè.
- 6) Muntar amb cobreobjectes i DPX.
- 7) Visualitzar amb microscopi (Nikon Eclipse E600) i quantificar per morfometria l'àrea fibròtica mitjançant el software AnaliSYS Soft Imaging System.

2) Determinació de l'apoptosi mitjançant l'assaig TUNEL

L'apoptosi en cèl·lules no parenquimals hepàtiques es va determinar mitjançant l'assaig TUNEL (In Situ Cell Detection Kit, Roche Diagnostics). Les seccions (5µm) de fetges parafinades es tenyeixen seguint el protocol:

- 1) Desparafinar i hidratar les seccions.
- 2) Delimitar amb un llapis hidrofòbic l'àrea d'incubació al voltant de cada tall.
- 3) Bloquejar la peroxidasa endògena amb H₂O₂ (0.3%) durant 20 minuts protegit de la llum.
- 4) Rentar amb PBS.
- 5) Permeabilitzar amb proteïnasa K (20 µg/ml en HCl-Tris 10 mM) durant 20 minuts.
- 6) Rentar amb PBS.
- 7) Marcatge: Posar 50 µl de *Label Solution* al control negatiu i 50 µl de reacció de marcatge a cada mostra (10% d'*Enzyme Solution* en *Label Solution*). Incubar 60 minuts a 37°C (en atmosfera humida i protegit de la llum).
- 8) Rentar amb PBS.
- 9) Incubar amb 50 µl de *POD-Converter* 30 minuts a 37°C.
- 10) Rentar amb PBS.
- 11) Convertir la senyal fluorescent en cromogènica mitjançant el substrat diaminobenzidina (DAB, Dako). Controlar el revelat sota microscopi òptic i parar la reacció amb H₂Od.
- 12) Contratenyir amb hematoxilina-eosina (1 minut) i rentar amb aigua corrent fins que viri.
- 13) Rentar amb H₂Od i deshidratar.
- 14) Muntar amb cobreobjectes i DPX.
- 15) Visualitzar amb microscopi a 200x i comptar el nombre de cèl·lules no-parenquimals positives per TUNEL a un total de 20 camps.

3) Detecció de macròfags positius per F4/80 per immunohistoquímica

L'antigen F4/80 és una glicoproteïna de macròfags que no expressen els limfòcits ni les cèl·lules polimorfonuclears. En aquests estudis es van detectar els macròfags a seccions (4 µm) de teixit adipós incloses en parafina seguint el protocol:

- 1) Desparafinar i hidratar les seccions.
- 2) Delimitar amb un llapis hidrofòbic l'àrea d'incubació al voltant de cada tall.
- 3) Desemascarar l'antigen amb 0.05% tripsina-0.1% CaCl₂ durant 20 minuts a 37°C i deixar 10 minuts a temperatura ambient.
- 4) Rentar amb PBS-Tween 20 0.5%, dos cops durant 2 minuts.
- 5) Bloquejar la peroxidasa endògena amb H₂O₂ (0.3%) durant 25 minuts protegit de la llum.
- 6) Rentar.
- 7) Incubar amb BSA 2% durant 20 minuts per evitar unions inespecífiques.
- 8) Anticòs primari: Incubar amb l'anticòs contra el F4/80 (1/250, amb 1% BSA, fet en rata contra ratolí de Serotec) *overnight* a 4°C. Per als controls negatius posar BSA 2% enlloc d'anticòs.
- 9) Rentar.
- 10) Incubar amb l'anticòs secundari biotinilitzat (dilució 1/200 amb BSA 1%) durant 30 minuts a T^a ambient.
- 11) Rentar.
- 12) Incubar amb el reactiu ABC (Vectastain® ABC kit, Vector) durant 30 minuts a T^a ambient.
- 13) Rentar.
- 14) Revelar el color amb DAB, controlar l'aparició de color amb el microscopi i parar la reacció amb H₂O_d (sol trigar un minut).

- 15) Contratenyir amb hematoxilina-eosina (1 minut) i rentar amb aigua corrent fins que viri.
- 16) Rentar amb H₂O_d i deshidratar.
- 17) Muntar amb cobreobjectes i DPX.
- 18) Visualitzar amb microscopi a 200x i comptar el nombre de cèl·lules positives per F4/80 a un total de 20 camps.

4) Tinció dels lípids hepàtics mitjançant oil-red-O

Per realitzar la tinció amb oil-red s'utilitzen seccions de fetge criopreservades: una porció de fetge es renta amb PBS, s'inclou amb OCT (*Optimal cutting temperature compound*), i després de congelar-lo amb isopentà fred, es guarda a -80°C. Les crioseccions (5 µm) es tenyeixen amb el següent procediment:

- 1) Fixar amb isopropanol (60%) durant 10 minuts.
- 2) Tenyir amb oil red-O (0.3% en isopropanol al 60%) durant 30 minuts.
- 3) Rentar amb isopropanol (60%).
- 4) Contratenyir amb hematoxilina de Gill (1 minut) i rentar amb aigua corrent.
- 5) Rentar amb una solució d'àcid acètic (4%).
- 6) Montar amb solució aquosa.
- 7) Visualitzar amb microscopi a 200x i quantificar automàticament l'àrea tenyida positivament amb el software AnaliSYS.

IV-DETERMINACIONS PROTEIQUES

1) Extracció de proteïnes totals

El següent procediment es va fer servir per extraure proteïnes fosforilades del teixit adipós. La composició dels tampons utilitzats està descrita a la taula 10 (VIII-Materials).

- 1) Homogeneïtzar amb Ultra-Turrax 100 mg de teixit adipós en 0.250 ml de tampó d'homogeneïtzació a 4°C.
- 2) Incubar els homogenats en gel durant 15 minuts a 4°C, vortexant les mostres cada 5 minuts.
- 3) Sonicar en gel.
- 4) Centrifugar a 16,000 *g* a 4°C durant 20 minuts.
- 5) Recollir l'infranadant, quantificar les proteïnes i congelar en alíquotes a -20°C.

El següent procediment es va fer servir per extraure proteïnes fosforilades dels adipòcits:

- 1) Centrifugar les cèl·lules a 500 *g* a 4°C.
- 2) Eliminar l'infranadant sota les cèl·lules amb una xeringa.
- 3) Rentar dos cops amb PBS fred.
- 4) Eliminar l'infranadant amb una xeringa deixant 200 µl.
- 5) Afegir 200 µl de tampó de lisi 2x a 4°C.
- 6) Passar a través d'una xeringa de 25G 10 cops, sense produir escuma.
- 7) Posar l'agitador orbital durant 2 hores a 4°C.
- 8) Sonicar en gel.
- 9) Vortexar i centrifugar a 16,000 *g* a 4°C durant 20 minuts.
- 10) Recollir l'infranadant, quantificar les proteïnes i congelar en alíquotes a -20°C.

2) Extracció de proteïnes nuclears

Els extractes nuclears d'explants de teixit adipós es preparen utilitzant el kit "Nuclear Extraction" (Millipore) amb adaptacions específiques per al teixit adipós, seguint el següent protocol:

- 1) Pesar 200 mg de teixit adipós i afegir 1 ml de *cytoplasmatic lysis buffer* (CB) a 4°C.
- 2) Homogeneïtzar el teixit amb un homogeneïtzador tipus Dounce en gel fins que no hi ha cap fibra visible.
- 3) Filtrar el lisat cel·lular a través d'una malla de niló de 250 µm en un eppendorf.
- 4) Centrifugar a 250 *g* a 4°C durant 5 minuts.
- 5) Descartar l'infranadant mantenint el pellet i la capa superior de greix.
- 6) Afegir 500 µl de CB.
- 7) Invertir i incubar a 4°C durant 15 minuts sense vortexar.
- 8) Centrifugar a 250 *g* a 4°C durant 5 minuts.
- 9) Descartar l'infranadant (deixant 200 µl) i afegir 2 µl de detergent.
- 10) Passar a través d'una xeringa de 25G 5 cops.
- 11) Posar els lisats a l'agitador orbital 1 hora a 4°C.
- 12) Sonicar en gel.
- 13) Centrifugar 8,000 *g* durant 20 minuts a 4°C per obtenir el nucli.
- 14) Descartar el sobrenadant, i netejar el tub de greix amb un bastonet.
- 15) Rentar amb 200 µl de CB fred fins que no quedi greix.
- 16) Afegir 100 µl de *nuclear lysis buffer*
- 17) Passar a través d'una xeringa de 25G 5 cops.
- 18) Posar els lisats a l'agitador orbital 1 hora a 4°C.
- 19) Centrifugar a 16,000 *g* durant 5 minuts a 4°C.
- 20) Recollir el sobrenadant (proteïna nuclear), quantificar les proteïnes i congelar en

alíquotes a -80°C .

3) Quantificació de proteïnes

Les proteïnes extretes es van quantificar amb el mètode BCA (Kit MicroBCA Protein Assay, Pierce) adaptat a microplaca:

- 1) Preparar les dilucions de les mostres adiposes: 1/50 o 1/100.
- 2) Preparar la recta estàndard amb BSA (2 mg/ml): 40, 20, 10, 5, 2.5, 1, 0.5 i 0 $\mu\text{g/ml}$ en el mateix medi en que es troben les mostres a quantificar.
- 3) Afegir 150 μl de les mostres i els estàndards a una placa de 96 pous.
- 4) Afegir a cada pou 150 μl de *Working Reagent* (Els reactius A:B:C es mesclen en una proporció 25:24:3, degut a que els medis d'extracció de proteïnes contenen quelants de Cu).
- 5) Incubar durant 2 hores a l'estufa a 37°C .
- 6) Mesurar l'absorbància a 562 nm a l'espectrofotòmetre de plaques i determinar la concentració a partir de la corba estàndard.

4) Determinació de l'activitat HSL i AMPK (Western blot)

L'activitat de la lipasa sensible a hormones (HSL) i de la quinasa depenent de AMP (AMPK) es va avaluar mitjançant l'estat de fosforilació d'aquestes. Per això es van utilitzar una sèrie d'anticossos, descrits a la taula 8 (VIII-Materials), amb la tècnica del western blot. Els tampons i medis utilitzats per al Western blot es troben a la taula 9 (VIII-Materials).

Per determinar l'activitat es van utilitzar mostres amb un contingut proteic de 80 μg seguint el protocol estàndard per western blot:

- 1) Preparar el gel de resolució (10% per a la HSL i 12% per a la AMPK) i el gel d'apilament en vidres de 1.5 mm i deixar polimeritzar.
- 2) Preparar les mostres a carregar: 80 µg de proteïna adiposa en tampó de càrrega Laemmli.
- 3) Calentar les mostres 5 minuts a 95°C.
- 4) Carregar les mostres a dins dels pous dels gels, que prèviament han estat disposats dins la cubeta amb tampó d'electroforesi. Desenvolupar l'electroforesi durant 2 hores a 120 V.
- 5) Desmuntar l'electroforesi, i mantenir el gel de resolució en tampó de transferència durant 15 minuts.
- 6) Activar les membranes de PVDF i muntar els cassets de transferència amb el gel, la membrana, el paper de filtre i les esponges.
- 7) Transferir les proteïnes del gels a la membranes durant 2 hores a 100 V i 4°C.
- 8) Comprovar l'eficiència de la transferència tenyint amb Ponceau S.
- 9) Incubar les membranes amb tampó de bloqueig durant 1 hora a temperatura ambient.
- 10) Incubar *overnight* a 4°C amb la solució d'anticòs primari per les proteïnes fosforilades.
- 11) Rentar amb TBS (amb 0.1% de Tween 20, tres cops).
- 12) Incubar amb l'anticòs secundari unit a peroxidasa durant 1 hora a temperatura ambient.
- 13) Rentar.
- 14) Incubar amb *ECL Detection System* (Amersham) durant 1 minut i visualitzar les bandes amb el LAS3000 (Fujifilm).
- 15) *Stripping* de les membranes: Incubar amb tampó d'*stripping* durant 20 minuts a 50°C amb agitació.
- 16) Rentar.
- 17) Incubar les membranes amb tampó de bloqueig durant 1 h.

- 18) Incubar *overnight* a 4°C amb la solució anticòs primari per les proteïnes totals.
- 19) Rentar.
- 20) Incubar amb l'anticòs secundari unit a peroxidasa durant 1 hora a temperatura ambient.
- 21) Rentar.
- 22) Incubar amb ECL i visualitzar.

5) **Activitat NF- κ B**

L'activitat del factor de transcripció NF- κ B es va determinar mitjançant el kit *NF- κ B EZ-Transcription Factor Assay* (Millipore) seguint el protocol recomanat per el fabricant. Es va fer servir a cada pou 5 μ g de proteïna nuclear procedent d'explants de teixit adipós incubats amb les condicions desitjades. La unió de les subunitats p50 i p65 del NF- κ B es va detectar per quimioluminiscència amb un luminòmetre per microplaques (Fluostar Optima).

V-ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA

1) Extracció de RNA amb RNAqueous

El kit RNAqueous (Ambion), que es basa en l'ús de columnes sense fenol, es va fer servir per extraure RNA del teixit hepàtic, de les cèl·lules RAW264.7, de les SVC aïllades del teixit adipós i dels adipòcits diferenciats 3T3-L1. El protocol que es va utilitzar va ser el següent:

Teixit:

- a) Posar 700 µl de *Lysis Binding Solution* i el teixit (50 mg) en un tub de vidre.
- b) Homogeneïtzar amb el Ultra-Turrax mantenint el tub en fred.
- c) Transvasar l'homogenat a un eppendorf i centrifugar a 14,000 rpm durant 3 minuts a 4°C per descartar la part insoluble.

Cèl·lules:

- a) Lisar les cèl·lules amb 700 µl de *Lysis Binding Solution*.
 - b) Recollir les cèl·lules, vortexar i passar a través d'una agulla de 25G per reduir la viscositat i trencar el DNA genòmic.
-
- 1) Afegir 700 µl d'EtOH 64%. Barrejar per inversió varies vegades.
 - 2) Transferir a una columna amb tub del kit i centrifugar a 14,000 rpm durant 1 minut.
 - 3) Descartar l'eluit. Si no s'ha pogut transferir tota la barreja en una sola vegada repetir el pas anterior.
 - 4) Afegir 700 µl de *Wash Solution 1* i centrifugar a 14,000 rpm durant 1 minut.
 - 5) Afegir 500 µl de *Wash Solution 2/3* i centrifugar. Fer un segon rentat amb 500 µl de *Wash Solution 2/3*.
 - 6) Descartar l'eluit i centrifugar 30 segons més per tal que la columna quedi ben seca.

- 7) Transferir la columna a un tub net (del kit).
- 8) Afegir 50 μ l d'*Elution Solution* (prèviament escalfada a 80°C) ben al mig de la columna i centrifugar 30 segons.
- 9) Fer una segona elució amb 20 μ L d'*Elution Solution*.
- 10) Congelar a -80°C abans de valorar per estabilitzar el RNA.

2) Extracció de RNA amb Trizol

El reactiu Trizol (Invitrogen) es va fer servir per extraure RNA del teixit adipós i dels adipòcits aïllats del teixit adipós. El protocol utilitzat va ser el següent:

Teixit:

- a) Posar 100 mg de teixit adipós en 1 ml de Trizol en un tub de vidre.
- b) Homogeneïtzar amb l'Ultra-Turrax.
- c) Transvasar l'homogenat a un eppendorf.

Cèl·lules:

- a) Centrifugar les cèl·lules adiposes i treure el infranadant amb una xeringa.
 - b) Lisar les cèl·lules amb 1 ml de Trizol passant-los per una pipeta.
-
- 1) Centrifugar a 12,000 *g* durant 10 minuts a 4°C.
 - 2) Recollir infranadant i descartar el sobrenadant lipídic i el pellet.
 - 3) Incubar 5 minuts a T^a ambient
 - 4) Afegir 0.2 ml de cloroform, agitar 15 segons i incubar 3 minuts a T^a ambient.
 - 5) Transferir la fase aquosa superior a un tub nou sense agafar la interfase per evitar contaminacions.
 - 6) Afegir 0.5 ml d' isopropanol per precipitar el RNA, incubar 10 minuts.

- 7) Centrifugar 10,000 *g* a 4°C durant 10 minuts.
- 8) Descartar el sobrenedant i rentar el pellet amb 1 ml d'EtOH 75%, mesclar amb el vòrtex.
- 9) Centrifugar 7,400 *g* a 4°C durant 5 minuts.
- 10) Eliminar el sobrenedant, els últims microlitres per capil·laritat i assecar la paret amb un bastonet.
- 11) Assecar el pellet a l'aire 5-10 minuts sense que s'assequi del tot.
- 12) Dissoldre el pellet en H₂O lliure de RNases (de 10 a 50 µl depenent de la mida del pellet). Si no es dissol el pellet, passar-lo per la pipeta.
- 13) Congelar a -80°C abans de valorar per estabilitzar el RNA.

3) Retrotranscripció del RNA

Els RNAs extrets van ser tractats amb el kit *DNA-free* (Ambion) per eliminar restes de DNA com a pas previ de la retrotranscripció. Les mostres de RNA es van retrotranscriure a cDNA mitjançant el kit "High-capacity cDNA archive kit" (Applied Biosystems) seguint el procediment indicat per el fabricant per a reaccions de 25 µl i 50 µl.

4) PCR convencional

Es van realitzar les PCRs durant 35 cicles amb la Taq DNA polimerasa d'Invitrogen. Cada un dels gens requereix unes condicions específiques de quantitat de DNA, concentracions de magnesi i *primers*, i T^a d'anillament, descrites a la taula 11 VIII-Materials).

L'especificitat dels primers es va confirmar amb seqüenciació directa dels productes amplificats durant les PCRs. Els productes de PCR van ser tractats amb Exo-SAP (per eliminar els primers i els dNTPs que queden sobrants de la reacció de PCR). La reacció de seqüenciació

es va realitzar utilitzant el reactiu "Big Dye Terminator version 3.1 Cycle Sequencing Kit" (Applied Biosystems) amb l'analitzador genètic ABI Prism 3130xl (Applied Biosystems). Un cop obtinguda la seqüència, es va comparar amb la base de dades del GenBank fent servir l'eina BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).

Els productes obtinguts amb la PCR van ser analitzats mitjançant electroforesi en gel d'agarosa (1.5%) visualitzant les bandes amb bromur d'etidi i un transiluminador UV. Com a marcador de pes molecular es va fer servir el 100-bp DNA Ladder (Invitrogen).

5) PCR a temps real

L'anàlisi quantitatiu de l'expressió gènica es va fer mitjançant PCR a temps real amb l'aparell "ABI Prism 7900 Sequence Detection System" (Applied Biosystems). Per quantificar els diferents gens es van utilitzar les sondes *TaqMan Gene Expression Assays* amb el gen β -actina com a control endogen (taula 12, VIII-Materials). Es van fer servir reaccions d'un volum total de 20 μ l amb 1.25 μ l del cDNA retrotranscrit com a motlle, *TaqMan Gene Expression Assays* (20x) i *TaqMan Universal Master Mix* (2x). Els resultats obtinguts van ser analitzats amb el software *Sequence Detector Software* (version 2.1; Applied Biosystems). La quantitat del gen diana va ser normalitzada amb la β -actina i relativa a un calibrador segons la fórmula del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (mètode de comparació dels *cycle threshold*, Ct).

VI-DETERMINACIÓ D'EICOSANOIDS

1) Extracció d'eicosanoids

Els eicosanoids es van extraure de mostres de teixit adipós epididimari mitjançant un sistema d'extracció en fase sòlida amb columnes C_{18} (*Sep-Pak, Waters*), seguint el següent procediment:

- 1) Pesar els teixits (100-200mg) i posar-los tubs de vidre amb 5 ml de MeOH-H₂O_d (65/35, v/v) a 4°C.
- 2) Afegir 50 ng de PGB₂ (Cayman) a cada mostra com a control intern.
- 3) Homogeneïtzar les mostres amb Ultra-Turrax en gel.
- 4) Mantenir les mostres a -20°C durant 1 hora.
- 5) Centrifugar els homogenats a 400 *g* durant 10 minuts a 4°C.
- 6) Muntar el sistema d'extracció al buit acoblat als cartutxos Sep-Pak i xeringues de 10 ml, i activar les columnes (passar 10 ml de MeOH i 10 ml de H₂O_d, controlar les vàlvules del sistema d'extracció per evitar que s'assequin els cartutxos).
- 7) Afegir H₂O_d a les mostres per que es trobin en un volum de 10 ml.
- 8) Acidificar amb HCl 0.1M per tal d'obtenir pH 3.5 (comprovar-ho amb tires reactives de pH).
- 9) Passar les mostres per els cartutxos.
- 10) Passar 10 ml H₂O_d.
- 11) Passar 10 ml hexà.
- 12) Passar 8 ml de formiat de metil i recollir l'eluit amb un tub de vidre (aquí s'elueix el LTB₄).
- 13) Passar 8 ml de MeOH i recollir l'eluit amb un tub de vidre (aquí s'elueixen els Cis-LTs).
- 14) Evaporar les fraccions de formiat de metil i MeOH sota corrent de N₂.
- 15) Ressuspendre en 1 ml de MeOH i guardar al -80°C fins a l'anàlisi.

2) Anàlisi d'eicosanoids per cromatografia líquida d'alta resolució en fase reversa (RP-HPLC)

Mitjançant RP-HPLC vam determinar els productes derivats de la via de la 5-LO del teixit adipós. Els estàndards utilitzats per determinar el temps de retenció va ser: PGB₂, LTB₄, LTC₄, LTD₄ i 5-HETE (tots procedents de Cayman). Les condicions i els materials que vam fer servir per l'anàlisi van ser les següents:

- Columna d'HPLC: C₁₈ Spherisorb ODS, 5 µm, 4.6 x 250 mm (Supelco)
- Fluxe: 1.2 ml/minut
- Fase mòbil A: MeOH/H₂O/Àcid acètic (65:35:0.01, v/v/v, pH 5.7)
- Fase mòbil B: MeOH/Àcid acètic (100:0.01, v/v)
- Gradient:

Temps (minuts)	Composició
0-36	100% fase A
36-37	gradient linear a 45% (v/v) fase B
37-55	45% (v/v) fase B
55-57	gradient linear a 100% fase B
57-61	100% fase B
62-80	100% fase A

- Detecció UV: 270 nm (0-40 minuts); 234 nm (40-60 minuts)

Les mostres evaporades sota corrent de N₂ es van ressuspèndre amb 100 µl de fase mòbil A i es van centrifugar 5 minuts a 3,000 rpm per sedimentar les parts insolubles. Cal purgar l'aparell d'HPLC abans de començar a punxar les mostres amb les dues fases que s'utilitzaran durant la carrera de les mostres. Una vegada l'aparell està purgat i ha assolit la pressió necessària es punxen les mostres al HPLC i s'elueixen amb les condicions descrites. La identificació dels compostos presents a les diferents mostres es va fer per comparació dels

temps de retenció dels pics amb els dels estàndards i es va determinar la concentració dels metabòlits d'interès comparant l'àrea dels pics amb la de l'estàndard intern (PGB₂). Segons aquestes condicions els temps de retenció són:

LTC ₄	7.88 min
PGB ₂	14.63 min
LTB ₄	28.23 min
LTD ₄	33.74 min
5-HETE	50.78 min

3) Anàlisi d'eicosanoids per assaig immunoenzimàtic (EIA)

Els nivells de LTB₄ i PGE₂ als sobrenedants cel·lulars i els de LTB₄ i Cis-LT als extractes lipídics de teixit adipós van ser determinats mitjançant EIA específics (Cayman) seguint les instruccions recomanades per el fabricant.

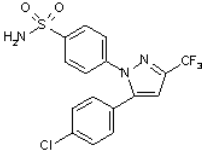
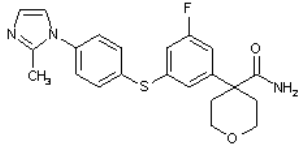
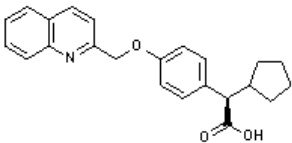
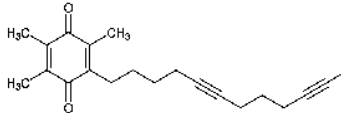
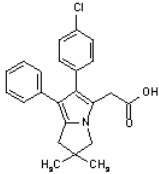
VII-MÈTODES ESTADÍSTICS

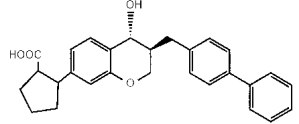
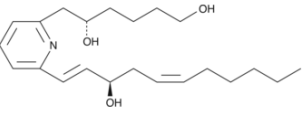
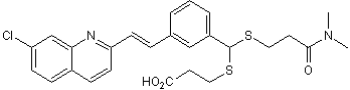
L'anàlisi estadístic dels resultats numèrics es va fer mitjançant el software GraphPad Prism (GraphPad Software for Science Inc., San Diego, California, USA). Segons el tipus de dades es van fer servir l'anàlisi de la variància, ANOVA d'una o dues cues, el test Bonferroni o el test t d'Student de dues cues. Els resultats han estat expressats com a mitjana ± error estàndard i vam considerar significatives les diferències amb $P < 0.05$.

VIII-MATERIALS

En aquesta secció es detallen els compostos utilitzats en els experiments *in vivo* i *in vitro* (taula 7), els anticossos utilitzats (taula 8), els medis de cultius dels experiments *in vitro* (taula 9), els tampons i solucions per al Western blot i l'extracció de proteïnes (taula 10), les condicions necessàries per reproduir les RT-PCR (taula 11) i les sondes *Taqman Gene Expression Assays* usades per a les PCR a temps real (taula 12).

Taula 7: Inhibidors i antagonistes utilitzats

Compost	Diana	Procedència	Fórmula	Dosi
SC-236	Inhibidor COX-2	Pfizer		6 mg/kg 0.1, 1, 3, 10 μ M
CJ-13,610	Inhibidor 5-LO	Pfizer		10 mg/kg 0.1, 1, 10 μ M
Bay-X-1005	Inhibidor FLAP	Bayer		100 mg/kg 30 μ M
AA-861	Inhibidor 5-LO	Biomol		1, 10, 15 μ M
Licofelone	Inhibidor COX/5-LO	Merckle		1, 10, 30 μ M

CP-105,696	Antagonista LTB-1	Pfizer		0.1 μ M
U-75302	Antagonista LTB-1	Cayman		1 μ M
MK-571	Antagonista CisLT-1	Cayman		1 μ M

Taula 8: Anticossos utilitzats per Western-blot i immunohistoquímica

Antigen	Procedència	Dilució	Hoste
<i>Western-blot</i>			
HSL Ratolí	Cayman	1/1000	Conill
Fosfo-HSL (Ser563) Ratolí	Cell Signaling Technology	1/1000	Conill
AMPK Ratolí	Cell Signaling Technology	1/1000	Conill
Fosfo-AMPK (Thr172) Ratolí	Cell Signaling Technology	1/1000	Conill
IgG-Conill	Amersham	1/2000	Ase
<i>Immunohistoquímica</i>			
F4/80 Ratolí	Serotec	1/200	Rata
IgG-Rata	Vector	1/200	Conill

Taula 9: Medis de cultiu cel·lular

Medi	Composició
Cultiu explants	DMEM amb 2% BSA lliure d'àcids grassos, 2 mM L-glutamina, 100 U/ml penicil·lina i 100 µg/ml estreptomicina
KR	Krebs-Ringer Bicarbonate Buffer (Sigma-Aldrich) Gasejar amb 95%-5%CO ₂ 20 minuts pH 7.4 i filtrar a 0.22 µm
Lisi eritròcits	NH ₄ Cl 155 mM, KHCO ₃ 10 mM, EDTA 0.1 mM
Adipòcits aïllats	10% FBS, 2 mM L-glutamina, 50 U/ml penicil·lina 50 µg/ml estreptomicina, 20 mM HEPES en medi DMEM gasejat amb 95%-5%CO ₂ 10 minuts pH 7.4 i filtrar a 0.22 µm
Fibroblastes	DMEM amb 10 % sèrum boví no fetal, 4 mM L-glutamina 50 U/ml penicil·lina i 50 µg/ml estreptomicina
Adipòcits	DMEM amb 10 % FBS, 4 mM L-glutamina, 50 U/ml penicil·lina i 50 µg/ml estreptomicina
Inducció d'adipòcits	DMEM amb 5 µg/ml insulina, 0.5 mM isometilbutilxantina 0.25 µM dexametasona, 10 % FBS, 4 mM L-glutamina 50 U/ml penicil·lina i 50 µg/ml estreptomicina
Continuació d'adipòcits	DMEM amb 5 µg/ml insulina, 10 % FBS, 4 mM L-glutamina 50 U/ml penicil·lina i 50 µg/ml estreptomicina
Raw	10% FBS, 2mM L-glutamina, 50 U/ml penicil·lina, 50 µg/ml estreptomicina en DMEM

Taula 10: Tampons i solucions per a l'extracció de proteïnes i Western blot

Tampó/Solució	Composició
Tampó d'homogeneïtzació	50 mM HEPES, 20 mM β -glicerol, 2 mM EDTA, 1% Igepal, 10% glicerol, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, 150 mM NaCl. Afegir just abans de l'ús: 10 mM NaF, 20 mM $Na_2P_2O_7$, 2 mM Na_3VO_4 i inhibidors de proteases
Tampó de lisi 2x	4 mM EGTA, 10 mM EDTA, 80 mM β -glicerol fosfat, 1% Igepal, 40 mM MOPS Afegir just abans de l'ús: 60 mM NaF, 20 mM $Na_2P_2O_7$, 4 mM Na_3VO_4 i inhibidors de proteases
Upper buffer	0.5 M Tris, pH 6.8
Lower buffer	1.5 M Tris, pH 8.8
Tampó d'electroforesi 10x	1.91 M Glicina, 251 mM Tris, 34,67 mM SDS
Tampó de càrrega Laemli 6x	7 ml Upper buffer, 3.6 ml glicerol, 1 g SDS, 600 μ l β -mercaptoEtOH, 4 g blau de bromofenol
Tampó de transferència 10x	1.91 M Glicina, 251 mM Tris
Tampó de transferència	70% H_2O_d , 20% MeOH, 10% Tampó de transferència 10x
TBS	20 mM Tris, 0.5 M NaCl, pH 7.6
Tampó de bloqueig	5% llet en pols desnatada i 0.1% Tween 20 en TBS
Solució d'anticòs	5% BSA, 0.1% Tween 20 en TBS amb la quantitat desitjada d'anticòs
Tampó d' <i>stripping</i>	100 mM β -mercaptoEtOH, 2% SDS, 62.5 mM Tris, pH 6.7
Gel de resolució al 10%	2.5 ml Acrilamida/Bisacrilamida 40%, 2.5 ml Lower buffer, 4.83 ml H_2O_d , 100 μ l SDS 10%, 60 μ l APS 10%, 5 μ l TEMED
Gel de resolució al 12%	3 ml Acrilamida/Bisacrilamida 40%, 2.5 ml Lower buffer, 4.29 ml H_2O_d , 100 μ l SDS 10%, 60 μ l APS 10%, 5 μ l TEMED
Gel d'apilació	0.9 ml Acrilamida/Bisacrilamida 40%, 1.2 ml Upper buffer, 7.22 ml H_2O_d , 100 μ l SDS 10%, 570 μ l APS 10%, 5 μ l TEMED

Taula 11: *Primers* i condicions utilitzats per les RT-PCR

Gen (GenBank)	Seqüència dels <i>primers</i>	pb	V _{RT} [MgCl ₂] [<i>primers</i>]	Condicions PCR
COX-1 (NM_008969)	S 5'-TCCCGGGGCTGATGCTCTTCTC-3' A 5'-CACCAGTGCCTCAACCCCATAGTC-3'	386	2.5 µl 0.25 mM 1 µM	96°C 30" 59°C 1' 72°C 30"
COX-2 (NM_011198)	S 5'-CAAGCAGTGGCAAAGGCCTCCA-3' A 5'-GGCACTTGCATTGATGGTGGCT-3'	459	2.5 µl 1 mM 0.375 µM	96°C 30" 64°C 1' 72°C 30"
5-LO (NM_009662)	S 5'-CCCCGAAGCTCCCAGTGACC-3' A 5'-TCCCGGGCCTTAGTGTTGATA-3'	492	2.5 µl 0.2 mM 0.5 µM	96°C 30" 52°C 1' 72°C 30"
FLAP (NM_009663)	S 5'-GGACCGGACTCTTGCCTTTGA-3' A 5'-GCGGGGAGATCGTCGTGCTTAC-3'	339	2.5 µl 1 mM 1 µM	96°C 30" 60°C 1' 72°C 30"
LTC4S (NM_008521)	S 5'-GCTGGCAATATGAAGGACGAAGTG-3' A 5'-TCGCTCGCCGGACGCTGAC-3'	141	2.5 µl 1 mM 0.5 µM	96°C 30" 56°C 1' 72°C 30"
LTA4H (NM_008517)	S 5'-GTGGCGAGGAACACAGCGGAAAGTA-3' A 5'-CGATGGCCTGGCACTGACTGAAGA-3'	330	3 µl 1 mM 1 µM	96°C 30" 59°C 1' 72°C 30"
12/15-LO (NM_007440)	S 5'-CCCACCGCCGATTTTCCACG-3' A 5'-AGTCCTCGCTCAGCCAACTCATCA-3'	333	2.5 µl 2 mM 1 µM	96°C 30" 56°C 1' 72°C 30"
LTB1 (NM_008519)	S 5'-GCCGCTGTGCCACTATGTCT -3' A 5'-CAGCCTGCGCCCGATGTC-3'	353	2.5 µl 1 mM 0.5 µM	96°C 30" 52°C 1' 72°C 30"
LTB2 (NM_020490)	S 5'-CGGGGCGACAAGGCACAC -3' A 5'-CCCGCGGCAGCAAATCC-3'	252	2.5 µl 1 mM 0.5 µM	96°C 30" 62°C 1' 72°C 30"
CisLT1 (NM_021476)	S 5'-AGAACAGTGGCCACAGTAAGAAGG-3' A 5'-TGCCAAAGAAACCCACAACAGA-3'	302	2.5 µl 1 mM 0.5 µM	96°C 30" 52°C 1' 72°C 30"
CisLT2 (NM_133720)	S 5'-AGGGCGACCGAAGGCAGAGGCAC -3' A 5'-GCCATTATATGTCCTTTGGAGTTCAAACCATTGC-3'	270	2.5 µl 1 mM 0.5 µM	96°C 30" 53°C 1' 72°C 30"
GAPDH (NM_008084)	S 5'-TCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3' A 5'-AGATCCACAACGGATACATT-3'	309	1 µl 1.5 mM 1 µM	96°C 30" 59°C 1' 72°C 30"

S: sentit A: antisentit pb: parell de bases del fragment amplificat

Taula 12: Sondes per ratolí *Taqman Gene Expression Assays*

Nom del gen	Nom complet	ID
ACC	Acetil-CoA carboxilasa	Mm01304285_m1
Adiponectin	Adiponectina	Mm00456425_m1
FASN	Sintasa d'àcids grassos	Mm00662319_m1
FLAP	Proteïna activadora de la 5-lipooxigenasa	Mm00802100_m1
LTC4S	Sintasa del LTC ₄	Mm00521864_m1
GLUT-4	Transportador de glucosa tipus 4	Mm00436615_m1
IL-6	Interleuquina-6	Mm00446190_m1
IRS-1	Substrat del receptor d'insulina 1	Mm01278327_m1
LPL	Lipoproteïna lipasa	Mm00434764_m1
MCP-1	Proteïna quimioattractant de monòcits 1	Mm00441242_m1
PPAR α	Receptor activat per proliferadors del peroxisoma α	Mm00440939_m1
PPAR γ	Receptor activat per proliferadors del peroxisoma γ	Mm00440945_m1
Resistin	Resistina	Mm00445641_m1
TNF- α	Factor de necrosi tumoral α	Mm00443258_m1
β -actin	β -actina	Mm00607939_s1

ANNEX II:
Altres publicacions

Altres publicacions derivades d'aquesta tesi doctoral:

1. Clària J, Horrillo R, Martínez-Clemente M, Morán-Salvador E, Titos E, González-Pérez A, Ferré N. Mecanismos básicos de lesión hepatocelular. Papel de los mediadores lipídicos de inflamación. Gastroenterol. Hepatol. 2008; 31: 682-692.
2. Clària J, Ferré N, González-Pérez A, López-Parra M, Horrillo R. Pharmacological modulation of cyclooxygenase and lipoxygenase pathways. A: Manuel Vázquez Carrera, ed. New emerging pharmacological targets in metabolic diseases. Editorial Research Signpost 2007; 1-26.

Publicacions relacionades amb aquesta tesi doctoral:

1. Titos E, Ferré N, Lozano JJ, Horrillo R, López-Parra M, Arroyo V, Claria J. Protection from hepatic lipid accumulation and inflammation by genetic ablation of 5-lipoxygenase. Prostaglandins Other Lipid. Mediat. 2010 (Acceptat).
2. López-Parra M, Titos E, Horrillo R, Ferré N, González-Pérez A, Martínez-Clemente M, Planagumà A, Masferrer JL, Arroyo V, Claria J. Regulatory effects of arachidonate 5-lipoxygenase on hepatic microsomal TG transfer protein activity and VLDL-triglyceride and apoB secretion in obese mice. J. Lipid Research 2008; 49: 2513-2523.

ANNEX III:
Presentacions a congressos

Els resultats de la present tesi doctoral han estat presentat als següents congressos:

1. 44th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, Copenhagen, 22-26 Abril, 2009. "5-Lipoxygenase activating protein, FLAP, signals adipose tissue inflammation and steatogenic potential in obesity" Horrillo R *et al.*
2. XXXIV Congreso Nacional de la Asociación Española para el Estudio del Hígado. Madrid, 25-27 Febrer, 2009. "La proteína activadora de la 5-lipooxigenasa, FLAP, señala el estado de inflamación crónica y la capacidad esteatogénica del tejido adiposo en modelos experimentales de obesidad" Horrillo R *et al.*
3. II International Workshop on Lipid Mediators, Valladolid, 12-13 Juny, 2008. "Multiple functions of 5-lipoxygenase on adipose tissue" Horrillo R *et al.*
4. 42nd Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, Barcelona, 11-15 Abril, 2007. "Relative contribution of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase pathways to liver inflammation and fibrosis" Horrillo R *et al.*
5. XXXII Congreso Nacional de la Asociación Española para el Estudio del Hígado. Madrid, 21-23 Febrer, 2007. "Contribución relativa de las vías de la ciclooxygenasa-2 y la 5-lipooxigenasa al desarrollo de inflamación y fibrosis en un modelo murino de daño hepático" Horrillo R *et al.*

AGRAÏMENTS

En aquesta secció voldria expressar el meu agraïment a totes les persones que m'han acompanyat durant aquest camí de quasi cinc anys. Tots vosaltres heu fet possible la realització d'aquest treball.

En primer lloc, vull donar les gràcies a la persona que ha influït més en aquest treball, el meu director de tesi, el Dr. Joan Clària. Gràcies per donar-me l'oportunitat de realitzar la tesi en el teu grup de recerca, per invertir esforç i dedicació en mi, i per donar-me bons consells.

Al Dr. Wladimiro Jiménez, cap del Servei de Bioquímica i Genètica Molecular del Hospital Clínic, i a la Dra. Montse Milà, cap de la Secció de Bioquímica Molecular, els vull agrair que hagin possibilitat la realització de part d'aquesta tesi en aquest Servei.

Vull donar les gràcies també al Dr. Vicente Arroyo, catedràtic de Medicina de la Universitat de Barcelona, per estar al front del nostre grup d'investigació, creure en la nostra feina i recolzar-nos en tot moment.

Especialment es mereixen estar en aquest apartat tots els companys i amics del grup de recerca, sense vosaltres no hagués estat possible, sempre disposats a col·laborar i ajudar-me en els bons i els no tant bons moments. A l'Ana, amb qui he compartit tantes hores al laboratori, sense tu hagués estat molt més difícil, moltes gràcies per ser-hi i per escoltar-me sempre. A l'Eva, va ser una alegria quan vas arribar, gràcies per ser tant espontània i per la intimitat de l'estoneta després de dinar, jeje. Al Marcos, per tenir les idees tan clares i ser una persona tan positiva. A l'Esther, moltes gràcies per els consells i saber que fer en tot moment. I també a la Cristina, que m'ha alegrat aquests últims dies. I a les que ja no hi són però sempre seràn presents: a la Marta, ets una persona irremplaçable, generosa i amable; a l'Anna, et desitjo molta sort; i a la Natàlia, ets una superwoman, sempre tant espontània i carinyosa. I per descomptat, a l'Anabel i a la Montse Bernat per estar sempre disposades ajudar en qualsevol moment.

No em puc oblidar del altres companys del laboratori patera: A la Montse, gràcies per ser tant autèntica i al Jordi, per fer-nos riure tantes vegades. I també al Pedro i al Javi, que amb les vostres històries m'heu fet passar bons moments. I als d'Hormonal que ens visiten de tant en tant al Dr. Manuel Morales, al Guillermo, i a la Vedrana (moltes gràcies per ser tant espontània i

Agraïments

lluïtadora). A la Pepa, que sempre troba solucions per als problemes. I a la Sònia Tugues, la personificació de la passió per la ciència, moltes gràcies per ser tant bona amiga i tenir sempre un moment per escoltar-me.

I als companys dels laboratori 503, Montse, Pau, Raquel, Oriol, Jose i Cristina, a veure si continuem repetint les tardes a l'Abadia. I a les que ja no hi són: Elena (se't troba molt a faltar) i Marlene. I al Dr. Ramón Bataller, que sempre ens anima amb les seves bromes.

A la Melina, l'Elisabet, la Marta, el Marc, la i Isa, la Esther (que sempre seràs de cardio), la Laia Llinàs i l'Eva Calpe, per les converses fugaces als passadissos i l'ascensor. A la Marce, moltes gràcies per compartir la teva experiència i estar sempre disposada a ajudar. I agrair-li a la Leire els seus consells sobre els animals. I per facilitar-me la feina durant la meva incursió al HPLC, moltes gràcies al Dr. Ramón Deulofeu i a la Carme.

Thanks also to all the people who helped me during my stay in Stockholm, especially to Dr. Jesper Z. Haeggström, Alicia and Dolo.

També vull estendre aquests agraïments als amics que m'han estat recolzant durant aquests anys. A l'Ester, moltes gràcies per estar sempre quan t'he necessitat, portem juntes des dels cinc anys, qui ho anava a dir! A la Maijo, sempre tant positiva i xerraire, seràs una mare excel·lent; i a la Carol i l'Elena també! Al Karel, que m'ha acompanyat des de la facultat, quantes cerveses i confidències hem passat! Als meus químics predilectes: Raúl i Salvador. I a tots els amics d'Artesa, especialment l'Anna i el Joan, que sempre m'ajuden a treure'm les preocupacions de sobre.

Per sobre tot vull agrair a la meva família el seu esforç i suport. Als meus pares, Martín i Conxita, sense els quals no hagués sigut possible arribar fins al final, sempre cuidant de mi i trobant totes les coses positives. A la meva sister Sònia, per tantes coses que hem compartit juntes, i als meus tiets. I al Joan, la persona amb qui he decidit compartir la vida, moltes gràcies per ser-hi sempre i per entendre l'esforç que implica aquesta professió.

Per tot això i molt més, **MOLTES GRÀCIES A TOTS!**

