



## ESTUDIO DE LA CITOCINA TWEAK Y DE SU RECEPTOR Fn14 EN EL CONTEXTO DE LA OBESIDAD.

Elsa Maymó Masip

Dipòsit Legal: T 322-2016

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

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

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

Elsa Maymó Masip

**ESTUDIO DE LA CITOCINA TWEAK Y DE SU RECEPTOR  
Fn14 EN EL CONTEXTO DE LA OBESIDAD**

TESIS DOCTORAL

Dirigida por  
Dr. Joan Vendrell Ortega y la Dra. Matilde Rodríguez Chacón

Departamento de Medicina y Cirugía



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona 2015

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA CITOCINA TWEAK Y DE SU RECEPTOR Fn14 EN EL CONTEXTO DE LA OBESIDAD.

Elsa Maymó Masip

Dipòsit Legal: T 322-2016



**UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI**  
**Departament de Medicina i Cirurgia**

Joan Josep Vendrell Ortega, Jefe de la Sección de Endocrinología y Nutrición del Hospital Universitari Joan XXIII de Tarragona y Profesor Titular del Departamento de Medicina y Cirugía de la Universidad Rovira i Virgili.

Matilde Rodríguez Chacón, Investigadora Miguel Servet Consolidada del Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili. Hospital Universitari Joan XXIII de Tarragona.

CERTIFICAN QUE:

La tesis doctoral titulada “**ESTUDIO DE LA CITOCINA TWEAK Y DE SU RECEPTOR Fn14 EN EL CONTEXTO DE LA OBESIDAD**”, presentada por **Elsa Maymó Masip** ha sido realizada bajo nuestra dirección y cumple los requisitos necesarios para optar al título de Doctora.

Y para que así conste y tenga los efectos oportunos, firmamos el presente documento

En Tarragona, a 1 de septiembre de 2015

Los directores de la tesis doctoral

Joan Josep Vendrell Ortega

Matilde Rodríguez Chacón

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA CITOCINA TWEAK Y DE SU RECEPTOR Fn14 EN EL CONTEXTO DE LA OBESIDAD.

Elsa Maymó Masip

Dipòsit Legal: T 322-2016

*“La vida es como un espejo,  
te sonríe si la miras sonriendo”*

Mahatma Gandhi

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA CITOCINA TWEAK Y DE SU RECEPTOR Fn14 EN EL CONTEXTO DE LA OBESIDAD.

Elsa Maymó Masip

Dipòsit Legal: T 322-2016

*Al Diego i als meus  
fills, Gabriel i Berta*



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA CITOCINA TWEAK Y DE SU RECEPTOR Fn14 EN EL CONTEXTO DE LA OBESIDAD.

Elsa Maymó Masip

Dipòsit Legal: T 322-2016

## AGRAÏMENTS

La realització d'aquesta tesi no hagués estat possible sense l'ajut i el recolzament d'algunes persones i els ho vull agrair explícitament.

En primer lloc, als meus directors de tesi, al Dr. Joan J. Vendrell Ortega i la Dra. Matilde Rodríguez Chacón, per donar-me l'oportunitat de formar-me com investigadora i per la seva dedicació i supervisió.

A la Mar i a la Cati, perquè la seva amistat i el seu positivisme m'han ajudat a tirar endavant i arribar al final d'aquest projecte.

A la Vicky, que des dels inicis ha estat al meu costat i hem compartit molt més que estones de feina. Sabia que podia comptar amb tu fins al final.

A la resta de companys i companyes del grup de recerca, la Kelly, la Carol, la Míriam, l'Enrique, la Noe, per la seva estima i el recolzament durant tot aquest temps. A tot el grup de recerca, a la Sonia, pel seu lideratge i a totes les professionals del servei d'endocrinologia que, directa o indirectament, han intervingut en la realització d'aquest treball d'investigació.

Vull agrair també a les institucions que engloben la xarxa professional que permet que duem a terme les nostres investigacions: el Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBER), l'Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV), l'Institut Català de la Salut (ICS), l'Hospital Universitari Joan XXIII de Tarragona (HJ23) i la Universitat Rovira i Virgili (URV).

A la meva mare, gràcies per ajudar-me i comprendre'm sempre i de manera incondicional i per transmetre'm els valors de la vida i de l'esforç. A les meves germanes, Gemma i Laia, que m'heu animat sempre fins al final, i al meu difunt pare li agraeixo el que sóc i el record que en tinc, segur que estaria ben orgullós.

I finalment, vull agrair al meu marit Diego la seva paciència i el seu recolzament incondicional; i als meus fills, el Gabriel i la Berta, que són la meva font de vida per voler seguir aprenent i millorant en tots els sentits.

## ÍNDICE GENERAL

<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>1</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>5</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>9</b>
<b>1. OBESIDAD</b> .....	<b>9</b>
1.1 Definición y clasificación.....	9
1.1 Prevalencia de la obesidad.....	10
1.2 Etiopatogénesis de la obesidad.....	11
1.3 Importancia clínica y patologías relacionadas.....	11
1.3.1 Resistencia a la insulina y Diabetes.....	12
<b>2. TEJIDO ADIPOSO</b> .....	<b>17</b>
2.1 Anatomía del tejido adiposo.....	17
2.2 Distribución del tejido adiposo blanco.....	20
2.3 Tejido adiposo blanco como órgano endocrino.....	23
<b>3. INFLAMACIÓN Y OBESIDAD</b> .....	<b>25</b>
3.1 Macrófagos e inflamación. Polarización de macrófagos.....	26
3.2 Hipoxia.....	29
3.3 Estrés oxidativo.....	33
3.4 Estrés de retículo endoplasmático.....	34
3.5 Citocinas.....	36
<b>4. Tumor Necrosis Factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK)</b> .....	<b>41</b>
4.1 Identificación.....	41
4.2 Estructura.....	42
4.3 Expresión.....	43
4.4 Receptores de TWEAK.....	44
4.4.1 <i>Fibroblast growth factor-inducible 14</i> (Fn14).....	44
4.4.2 <i>Cluster of Differentiation 163</i> (CD163).....	46
4.5 sTWEAK y sCD163 como biomarcadores.....	47
4.6 Señalización de TWEAK.....	50
4.7 Actividades biológicas de TWEAK.....	55
4.7.1 Apoptosis.....	55
4.7.2 Actividad proinflamatoria.....	56
4.7.3 Proliferación.....	57
4.7.4 Regeneración tisular.....	57
4.7.5 Actividad proangiogénica.....	57
4.7.6 Diferenciación.....	58
4.7.7 Migración.....	59

<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>63</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>65</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>69</b>
<b>RESUMEN RESULTADOS.....</b>	<b>101</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>105</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>121</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>125</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>151</b>

## ABREVIATURAS

<b>ADIPOQ:</b> Adiponectina	<b>CV:</b> Cardiovascular
<b>ADNc:</b> Ácido Desoxiribonucleico complementario	<b>DG:</b> Diabetes Gestacional
<b>AOSMC:</b> Células musculares lisas de pared vascular	<b>DMT1:</b> Diabetes Mellitus Tipo 1
<b>AP-1:</b> Proteína Activadora 1	<b>DMT2:</b> Diabetes Mellitus Tipo 2
<b>APO3L:</b> Ligando de Apoproteína 3 (TWEAK , TNFSF12 o CD255)	<b>eIF2<math>\alpha</math>:</b> Subunidad alfa del factor 2 de iniciación de traducción eucariótico
<b>ARN:</b> Ácido ribonucleico	<b>ERK:</b> Quinasa regulada por señales extracelulares
<b>ARNm:</b> Ácido ribonucleico mensajero	<b>FACS:</b> Separación celular con activación de fluorescencia
<b>ATF4 y 6:</b> Factor activador de la transcripción 4 y 6	<b>FADD:</b> Proteína adaptadora que contiene un dominio de muerte citosólico
<b>BAFF:</b> Factor activador de células B	<b>FIAF o ANGPTL4:</b> Factor inducido por ayuno
<b>BiP o GRP78:</b> Proteína de unión a inmunoglobulinas o Proteína regulada por glucosa 78	<b>Fn14:</b> del inglés, <i>Fibroblast growth factor-inducible 14</i> (TNFRSF12A)
<b>CC:</b> Circunferencia de la cintura	<b>FOXO3A:</b> Factor de transcripción con dominio <i>forkhead 3</i>
<b>CD163:</b> <i>Cluster</i> de diferenciación 163	<b>FSV:</b> Fracción estroma vascular
<b>CD206:</b> receptor de manosa	<b>GLUT-1:</b> Transportador de glucosa 1
<b>CD40L :</b> Ligando de CD40	<b>GMCSF:</b> Factor estimulante de colonias de granulocitos
<b>CD86:</b> <i>Cluster</i> de diferenciación 86	

<b>GTPasas:</b> Guanosinas trifosfatasa	<b>IL-1a:</b> Antagonista del receptor de la interleucina 1
<b>HbA<sub>1c</sub> :</b> Hemoglobina glicosilada	<b>IL-1R:</b> Receptor de la interleucina 1
<b>HIF-1:</b> Factor inducido por hipoxia 1	<b>IL-23:</b> Interleucina 23
<b>HIF-1<math>\alpha</math>:</b> Subunidad alfa del factor inducible por hipoxia 1	<b>IL-4:</b> Interleucina 4
<b>HIF-1<math>\beta</math>:</b> Subunidad beta del factor inducible por hipoxia 1	<b>IL-6:</b> Interleucina 6
<b>HMVEC-d:</b> células endoteliales microvasculares derivadas de dermis humana	<b>IL-8:</b> Interleucina 8
<b>HOMA-IR:</b> del inglés, <i>homeostatic model assessment for insulin resistance</i>	<b>IMC:</b> Índice de masa corporal
<b>HSL:</b> Lipasa sensible a hormona	<b>iNOS:</b> Óxido nítrico sintasa inducible
<b>HUVEC:</b> Células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano	<b>IP-10:</b> Proteína 10 inducida por IFN $\gamma$
<b>ICAM-1:</b> Molécula de adhesión intracelular 1	<b>IRE1:</b> Enzima con requerimiento de inositol 1
<b>ICC:</b> Índice de cintura-cadera	<b>I<math>\kappa</math>B:</b> Inhibidor kappa B
<b>IFN<math>\gamma</math>:</b> Interferón gamma	<b>I<math>\kappa</math>B<math>\alpha</math>:</b> Subunidad $\alpha$ de I $\kappa$ B
<b>IKK:</b> Complejo de quinasas que fosforilan I $\kappa$ B	<b>JNK:</b> Quinasa <i>c-jun</i> N-terminal
<b>IL-1:</b> Interleucina 1	<b>KDa:</b> Quilodaltons
<b>IL-10:</b> Interleucina 10	<b>KO:</b> <i>Knock-out</i>
<b>IL-12:</b> Interleucina 12	<b>LEP:</b> Leptina
<b>IL-13:</b> Interleucina 13	<b>LPL:</b> Lipasa de lipoproteína
	<b>LPS:</b> Lipopolisacárido
	<b>LT b:</b> Linfotoxina b
	<b>MAPK:</b> Vía de las mitógeno quinasas

**MCP-1/ CCL-2:** Citocina quimioatrayente de los monocitos  
1

**MHC-II:** Complejo mayor de histocompatibilidad II

**MIF:** Factor inhibidor de la migración de los macrófagos

**MMP 2 y 9:** Metaloproteinasas 2 y 9

**MR:** macrófagos reguladores

**NF- $\kappa$ B:** Factor nuclear *kappa* B

**NHDF-neo:** fibroblastos humanos de la dermis neonatales

**NIK:** Quinasa inductora de NF- $\kappa$ B

**NK:** del inglés, *natural killer* o células asesinas naturales

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**p38 MAPK:** Proteína 38 de las mitógeno quininas

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

**PERK:** Quinasa asociada al retículo endoplasmático similar a la ARN quinasa

**PI3K/Akt:** Fosfoinositol 3 quinasa/Akt

**PPAR $\gamma$ :** Proliferador del peroxisoma *gamma*

**RANKL:** Ligando de receptor activador para el factor nuclear *kappa* B

**RANTES o CCL5:** del inglés, *regulated upon activation, normally T-expressed* o ligando 5 de citocina CC

**RE:** Retículo endoplasmático

**RI:** resistencia a la insulina

**RIP1:** Proteína inactivadora de ribosomas 1

**ROS:** Especies reactivas del oxígeno

**SEEDO:** Sociedad española para el estudio de la obesidad

**SRCR:** Receptor *scavenger* rico en cisteínas

**TAB:** Tejido adiposo blanco

**TAK:** Quinasa activada por el factor de crecimiento transformable beta

**TAM:** Tejido adiposo marrón

**TAS:** Tejido adiposo subcutáneo

**TAV:** Tejido adiposo visceral

**Th:** Linfocitos T colaboradores

**TLRs:** Receptores de tipo *Toll*

**TNF:** Factor de necrosis tumoral (familia)

**TNFR:** Receptor de TNF



**TNFRSF:** Superfamilia de receptores del TNF

**TNFSF11:** Miembro 11 de la Superfamilia del TNF

**TNF $\alpha$ :** factor de necrosis tumoral alfa

**TRAF:** Factores que se asocian al receptor del TNF

**TRAIL:** Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF $\alpha$

**TWEAK:** *Tumor Necrosis Factor -like weak inducer of apoptosis*, inductor débil de apoptosis parecido al TNF

**UCP-1:** Proteína desacopladora 1

**UPR:** Respuesta a proteínas mal plegadas

**VEGF:** Factor de crecimiento endotelial vascular

**VLDL:** lipoproteína de muy baja densidad

**XBP-1:** Proteína de unión *X-box* 1

## RESUMEN

La inflamación sistémica crónica que existe en la obesidad está mediada por la presencia de citocinas proinflamatorias, tanto a nivel sistémico como local. Esta inflamación se ve favorecida por la presencia de hipoxia local y estrés de retículo endoplasmático en el tejido adiposo.

TWEAK es una citocina de la familia del Factor de necrosis tumoral (TNF) implicada en diversas actividades biológicas como proliferación, diferenciación, inflamación, migración, incluso muerte celular, y señala a través de su receptor Fn14. Esta citocina se encuentra unida a membrana (mTWEAK) o en forma soluble (sTWEAK) tras un procesamiento proteolítico. Los niveles de sTWEAK están disminuidos en enfermedades cardiovasculares. Además, se ha descrito que sTWEAK puede interferir de forma negativa en la actividad proinflamatoria de TNF $\alpha$ .

Los datos que se muestran a continuación indican que TWEAK y Fn14 se sobreexpresan en el tejido adiposo de obesos severos. Curiosamente, los adipocitos del tejido adiposo subcutáneo de éstos pacientes muestran una mayor expresión de Fn14, mientras que los macrófagos de tipo M2 expresan mTWEAK. Además, demostramos que TWEAK actúa como una citocina proinflamatoria sobre el adipocito y que sólo la inflamación, pero no la hipoxia ni el estrés de retículo pueden regular la expresión de TWEAK en el macrófago y de Fn14 en el adipocito. A pesar de esta capacidad inflamatoria, hemos demostrado una actividad competitiva de sTWEAK con TNF $\alpha$ , al interferir con éste en eventos de señalización en el adipocito, provocando una modulación de la respuesta inflamatoria inducida por TNF $\alpha$  sobre este tipo celular. Respecto a sTWEAK, la disminución observada en suero de los pacientes con obesidad severa podría favorecer la respuesta inflamatoria de TNF $\alpha$  en dicho contexto. Los resultados que recoge esta tesis apuntan a que el eje TWEAK/Fn14 tiene un papel relevante en la fisiopatología de la obesidad.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA CITOCINA TWEAK Y DE SU RECEPTOR Fn14 EN EL CONTEXTO DE LA OBESIDAD.

Elsa Maymó Masip

Dipòsit Legal: T 322-2016

# INTRODUCCIÓN

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA CITOCINA TWEAK Y DE SU RECEPTOR Fn14 EN EL CONTEXTO DE LA OBESIDAD.

Elsa Maymó Masip

Dipòsit Legal: T 322-2016

# INTRODUCCIÓN

## 1. OBESIDAD

### 1.1 Definición y clasificación

En la sociedad del siglo XXI, la obesidad se ha convertido en uno de los mayores problemas de salud pública. En la última década, la prevalencia de la obesidad ha aumentado y continúa incrementándose de forma alarmante, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. Por ello, la Organización Mundial de la Salud (OMS) la definió como “la enfermedad epidémica no transmisible más grande del mundo”<sup>171</sup>, considerando como obesidad y sobrepeso la acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud. Por su parte, la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO), se refiere a la obesidad como una enfermedad crónica caracterizada por el aumento de peso, que se produce por un desequilibrio prolongado en el balance energético, entre la ingesta calórica y el gasto energético<sup>10</sup>.

Una manera sencilla de medir la obesidad es mediante el índice de masa corporal (IMC), también conocido como el índice *de Quetelet*. El IMC está estrechamente relacionado con el porcentaje de grasa corporal y se determina mediante la fórmula  $IMC = (\text{peso, Kg}) / (\text{altura, cm})^2$ . Según la OMS, una persona con un IMC igual o superior a 25 se considera con sobrepeso y obesa con un IMC igual o superior a 30 (tabla 1).

Existen otras medidas antropométricas para evaluar la distribución de grasa corporal como son la circunferencia de la cintura (CC) y el índice cintura cadera (ICC). Además, también se puede determinar la grasa corporal por el método de los pliegues cutáneos, por impedancia, o bien métodos más complejos como la tomografía computarizada, la resonancia magnética y la absorciometría.

<b><i>Clasificación</i></b>	<b><i>IMC</i></b>
<b>Bajo peso</b>	<b>&lt;18.50</b>
<b>Rango normal</b>	<b>18.50- 24.99</b>
<b>Sobrepeso</b>	<b>≥25.00</b>
Pre-obesidad	25.00- 29.99
<b>Obesidad</b>	<b>≥30.00</b>
Obesidad clase I	30.00- 34.99
Obesidad clase II	35.00- 39.99
Obesidad clase III (mórbida o severa)	<b>≥40.00</b>

**Tabla 1. Clasificación internacional de la obesidad según el IMC.** Fuente: adaptada de la OMS 2014 y 2015.

La CC es ampliamente utilizada como índice de obesidad central, y está muy relacionada con patologías con elevado riesgo cardiovascular. Los puntos de corte a partir de los cuales aumenta el riesgo de complicaciones metabólicas establecidos por la OMS son: CC mayor de 94 cm para los hombres y mayor de 80 para las mujeres; e ICC mayor de 0.90 para hombres y mayor de 0.85 para mujeres<sup>240</sup>.

## 1.1 Prevalencia de la obesidad

La obesidad se ha considerado como la epidemia del siglo XXI. Su prevalencia mundial se ha multiplicado por más de dos entre 1980 y 2014, de manera que en el año 2014, alrededor del 13% de la población adulta era obesa y el 39% tenía sobrepeso. En España los datos de prevalencia de la obesidad en adultos, surgidos del estudio de *Di@bet.es*, indican que el 26,6% de la población es obesa y el 40,5% tiene obesidad abdominal, datos que evidencian la altísima prevalencia de esta patología en nuestro país<sup>233</sup>.

El sobrepeso y la obesidad son el quinto factor de riesgo de defunción en el mundo y cada año fallecen por lo menos 3,4 millones de personas adultas como consecuencia del sobrepeso o la obesidad<sup>171</sup>.

## 1.2 Etiopatogénesis de la obesidad

La obesidad es una enfermedad crónica compleja de origen multifactorial que aparece por la influencia interactiva de factores sociales, ambientales, psicológicos, metabólicos, celulares y moleculares y que conlleva gran transcendencia sociosanitaria y económica. El desequilibrio entre la ingesta y el consumo energético junto con un estilo de vida sedentario y una carga energética desfavorable constituyen el principal factor de riesgo de obesidad, especialmente en las culturas occidentales (Figura 1).

El conocimiento de la etiopatogenia de la obesidad es imprescindible para el desarrollo de estrategias para controlar esta enfermedad. La modificación de factores ambientales como los hábitos alimentarios, el aumento de la actividad física y el descubrimiento de nuevas herramientas moleculares con finalidades terapéuticas son aspectos claves en la prevención y tratamiento de la obesidad.

## 1.3 Importancia clínica y patologías relacionadas

La obesidad constituye un grave problema de salud pública, su importancia radica tanto en la morbilidad que se le asocia como en la mortalidad que lleva asociada. El exceso de peso es un factor de riesgo para la aparición de enfermedades de entre las que destacan la dislipemia, la hipertensión arterial, la enfermedad coronaria y cerebrovascular, algunos tipos de cáncer y la diabetes tipo 2 (DMT2), entre las más destacadas<sup>192</sup> (Figura 1).

La obesidad y la DMT2 son enfermedades muy relacionadas que comparten mecanismos de evolución y aparición. De hecho, el 80% de los individuos diabéticos son obesos o tienen sobrepeso. El estudio *Di@bet.es* mostró que la prevalencia de la diabetes en España es del 13.8% y aumenta considerablemente con la edad. Además, es algo



mayor en hombres que en mujeres y la prevalencia de obesidad aumenta significativamente con la presencia de diabetes<sup>211</sup>.

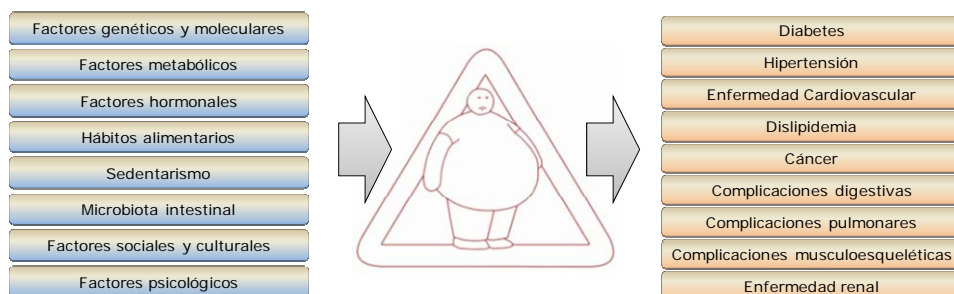


Figura 1. Etiología y consecuencias de la obesidad.

La distribución anatómica del tejido adiposo en el organismo es un factor determinante en el riesgo de padecer una enfermedad cardiovascular. En este sentido se distingue entre obesidad androide o masculina o en forma de manzana (cuando la grasa le localiza principalmente en el abdomen, la cara y el tórax) y obesidad ginoide, periférica o en forma de pera (grasa en los muslos, los glúteos y la región femoral). La grasa intraabdominal se relaciona con mayor riesgo de enfermedad cardiovascular y mortalidad<sup>179,182</sup>.

### 1.3.1 Resistencia a la insulina y Diabetes

La obesidad está relacionada en la mayoría de los casos con la resistencia a la insulina. La insulina es la hormona liberada por las células beta del páncreas que permite la entrada de glucosa a las células de los órganos diana como el músculo, el hígado y el tejido adiposo.

En situaciones anormales como la obesidad, el exceso de ácidos grasos que no pueden ser almacenados en los adipocitos bloquea las señales de la insulina en los tejidos creándose **resistencia a la insulina (RI)** e impidiendo que dichos tejidos puedan responder adecuadamente a la acción de la insulina.

Una forma sencilla de medir la RI es mediante el índice HOMA-IR (del inglés *Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance*), descrito por Matthews en el 1985<sup>151</sup> y se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\text{HOMA-IR} = [\text{insulina } \mu\text{UI/mL} \times \text{Glucemia mg/dL}] / 405$$

A nivel celular, la insulina se une a su receptor y se fosforila el sustrato del receptor de insulina 1 (IRS-1) en los aminoácidos tirosina, activando así la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K), que a su vez activa la translocación de los transportadores de glucosa a la membrana celular, permitiendo así la entrada de glucosa en las células. Los ácidos grasos libres dan lugar a la activación de la proteína quinasa C que también fosforila el IRS pero, en este caso, en otros residuos de serina, impidiendo la acción de la insulina y dando lugar a la RI.

Las células beta del páncreas intentan compensar la RI sintetizando más hormona, pero llega un momento en que a pesar del aumento compensatorio en la producción de insulina, los tejidos son incapaces de metabolizar adecuadamente la glucosa, dando lugar a una hiperglucemia franca lo que puede acabar derivando en la aparición de una diabetes mellitus tipo 2<sup>209</sup>.

La **Diabetes Mellitus tipo 2 (DMT2)** es un trastorno que se caracteriza por presentar hiperglucemia crónica en sangre como consecuencia de la RI asociado a un defecto en la función secretora de la célula beta del páncreas. Las causas de la enfermedad son complejas y no se conocen con exactitud, aunque se sabe que está muy relacionada con la obesidad, la poca actividad física, la alimentación inadecuada y la hipertensión, presentando, además, un componente genético importante<sup>119</sup>.

La DMT2 supone el 80-90% de todos los casos de DM, afecta a un 12% de la población española y constituye, un problema sociosanitario y económico de primera magnitud que en los próximos años va a adquirir características epidémicas, sobre todo en los países occidentales.

La importancia relativa de los defectos en la secreción de insulina o en la acción periférica de la hormona en la aparición de la DMT2 siguen siendo elementos clave en la patogénesis de esta enfermedad. Considerando la estrecha relación que guardan la secreción de insulina y la sensibilidad a la acción de la hormona en el control de la homeostasis de la glucosa, es difícil asignar de forma inequívoca el papel que cada una de ellas juega en la etiopatogenia de la DMT2. Además, ambos fenómenos suelen coexistir y participan en una proporción diferente en la fisiopatología de la enfermedad, no sólo según la población estudiada, sino también según el período evolutivo de la misma<sup>78</sup>.

Por otro lado, la expresión fenotípica de los defectos genéticos que condicionan las alteraciones en la secreción de insulina y en su acción periférica se encuentra modulada por diversos factores ambientales, muchos de ellos consecuencia directa de estas propias alteraciones. En las situaciones en las que predomina la RI, la masa de células beta sufre una transformación capaz de aumentar su oferta de insulina y compensar la excesiva y anómala demanda. Sea cual sea el defecto inicial en la patogenia de la DMT2, el fracaso de la célula beta pancreática es una condición necesaria en la aparición clínica final de la enfermedad<sup>72</sup>. Existen diversos elementos que afectan a la célula beta, entre los que se encuentra el efecto tóxico de algunos ácidos grasos libres circulantes. La mayoría de los triglicéridos del cuerpo se encuentran en el tejido adiposo (>95%) y la lipólisis determina el suministro de ácidos grasos sistémicos; la insulina y las catecolaminas son los principales reguladores de este proceso. La insulina tiene un efecto antilipolítico que se pierde en la diabetes incrementándose la lipólisis e induciendo hipertrigliceridemia mediante la producción de lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), proceso que contribuye a la aterogénesis. Las cadenas largas de ácidos grasos en el plasma normalmente son reguladas por la insulina, y durante la RI, incrementan y producen toxicidad de células beta (lipotoxicidad), que junto con la toxicidad de la hiperglucemia favorecen el fenómeno de lipo-glucotoxicidad sobre la célula beta.

El tejido adiposo tiene la capacidad de liberar diversas proteínas prodiabéticas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), la interleucina 6 (IL-6), la leptina (LEP), varias adipocitocinas, resistina y ácidos grasos libres, los cuales están incrementados en la obesidad y pueden afectar a las células beta. La lipólisis es el proceso en el que los triglicéridos son hidrolizados a mono y diglicéridos intermedios hasta ácidos grasos y glicerol mediante la activación de la lipasa sensible a hormona (HSL). La insulina estimula la lipasa de lipoproteína (LPL), que se encarga de fraccionar en partículas a las lipoproteínas unidas a triglicérido para que, de esta manera, puedan incorporarse al tejido adiposo. Algunos ácidos grasos libres y lipoproteínas pueden resultar dañinos para la célula beta<sup>147,25,169</sup>.

Los pacientes con diabetes presentan una mayor incidencia de enfermedades como la insuficiencia renal, la retinopatía, la neuropatía periférica, y un mayor riesgo de padecer cardiopatías y accidentes cerebro-vasculares que la población general, lo que conlleva una mayor morbilidad y mortalidad<sup>66,216,222,189,163</sup>.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA CITOCINA TWEAK Y DE SU RECEPTOR Fn14 EN EL CONTEXTO DE LA OBESIDAD.

Elsa Maymó Masip

Dipòsit Legal: T 322-2016

## 2. TEJIDO ADIPOSO

### 2.1 Anatomía del tejido adiposo

El tejido adiposo es un tejido conjuntivo mesenquimal derivado del mesoderma embrionario que representa entre un 15 y un 25% del peso corporal<sup>81</sup>. En los mamíferos, el tejido adiposo está compuesto al menos por dos tipos muy distintos de grasas, como son el tejido adiposo blanco y el tejido adiposo marrón o pardo (TAM), que presentan diferencias en cuanto a su morfología, distribución y función.

El **tejido adiposo blanco (TAB)** es el principal almacén de energía, además de atribuírsele la función de aislamiento y protección mecánica para algunos órganos vitales. También se sabe que posee una importante actividad metabólica y endocrina (autocrina y paracrina) sobre sí mismo y sobre otros tejidos<sup>124,229</sup>.

En humanos el TAB se encuentra disperso en el organismo. A nivel intraabdominal encontramos los mayores depósitos alrededor del omento, del intestino y de las áreas perirrenales; a nivel subcutáneo, la grasa se localiza sobre todo a nivel de las nalgas, los muslos y el abdomen. Además, también podemos encontrar TAB a nivel pericardial, perivascular o periarterial, periarticular, retroorbital, intramuscular, cara y médula ósea. La distribución de la grasa corporal varía con la edad y está influida por factores genéticos y por el sexo<sup>67</sup>.

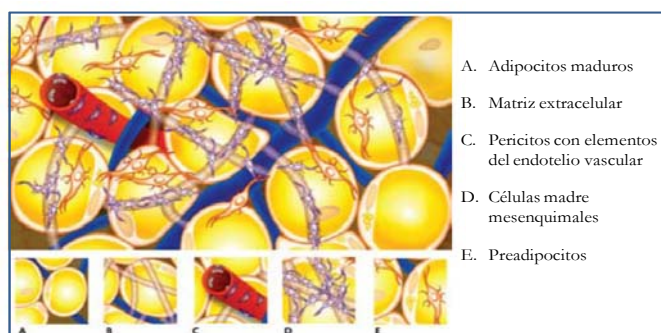
Los **adipocitos** son las principales células del TAB, derivan de los fibroblastos y se caracterizan por tener una sola vesícula de grasa que ocupa casi todo el volumen celular, quedando el citosol, los orgánulos y el núcleo en una estrecha franja a la periferia. Los adipocitos almacenan los ácidos grasos en forma de triglicéridos en el interior de la gota lipídica. Su tamaño es variable (entre 10 y 100  $\mu\text{m}$ ), y dependiendo del estado nutricional, pueden aumentar o disminuir su capacidad según contengan más o menos ácidos grasos. El volumen de los adipocitos refleja el balance entre lipogénesis y lipólisis; y el número de adipocitos

en el tejido es el reflejo del equilibrio entre la proliferación, la diferenciación y la apoptosis de los adipocitos y sus precursores.

Los adipocitos son las células mayoritarias en cuanto a volumen en el tejido adiposo blanco, pero se ha descrito que entre un 60-80% de las células del tejido no son adipocitos sino que corresponden a células del componente estromático (o fracción estroma-vascular (FSV))<sup>67</sup>.

Entre estas células de la FSV se encuentran preadipocitos, monocitos activados, macrófagos, componentes perivasculares de la matriz (pericitos y células endoteliales) y células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo<sup>3,67</sup> (Figura 2). También se ha descrito la presencia de neutrófilos<sup>64</sup>, linfocitos T y linfocitos T reguladores<sup>73,3</sup>.

La proporción de los diferentes tipos celulares presentes en el estroma vascular puede variar según la situación fisiológica y la localización del tejido adiposo. Pero todos ellos forman una unidad integrada y muy activa funcionalmente en el tejido<sup>124</sup>.



**Figura 2. Principales tipos celulares presentes en el tejido adiposo.** Fuente: adaptada de Alexander, et al. 2012<sup>3</sup>

El **tejido adiposo marrón o pardo (TAM)** es un sitio clave de producción de calor (termogénesis) en los mamíferos. Tiene aspecto lobulado, recordando una glándula y está altamente irrigado (más que el TAB) e innervado por fibras nerviosas. A diferencia de los adipocitos blancos clásicos que aparecen de color blanco debido a su contenido en

lípidos, los adipocitos del tejido marrón y el tejido en sí, deben su coloración a la cantidad de citocromos mitocondriales.

Los adipocitos marrones del TAM tienen forma poliédrica, son más pequeños, multiloculares y muy ricos en mitocondrias que contienen la proteína desacopladora-1 (UCP1) que incrementa la actividad de la cadena respiratoria. El calor es generado a partir de la combustión de los sustratos disponibles y es distribuido al resto del cuerpo a través de la circulación<sup>95,257</sup>.

Los adipocitos que expresan la UCP-1 también se desarrollan entre el TAB en respuesta a diversos estímulos y son conocidos con varios nombres: beige, “*brite*” (*brown in white*), *iBAT* (*induced BAT*), *BAT reclutable* y *wBAT* (*white adipose BAT*)<sup>239</sup>. Así, se pueden distinguir dos tipos de tejido marrón, o dos tipos de células marrones con capacidad termogénica, los adipocitos pardos o marrón clásicos y los beige<sup>136,239</sup>.

Las células beige del TAB, como ocurre con los adipocitos marrones del TAM, son definidas por su morfología multilocular, el alto contenido de mitocondrias y la expresión de un conjunto de genes específicos de la grasa marrón. Sin embargo, las células marrones y beige tienen algunas características que permiten diferenciarlas por lo que deben ser consideradas como tipos de células distintas.

En primer lugar, las células beige, al menos en los depósitos subcutáneos, no derivan de los mismos precursores embrionarios que dan origen a los adipocitos marrones<sup>203</sup>. En segundo lugar, existe un número de factores asociados con el desarrollo inducido de los adipocitos beige pero no de los marrones, lo que sugiere que estos tipos de células son regulados de maneras diferentes<sup>260</sup>. En tercer lugar, los adipocitos beige y marrones expresan distintos genes<sup>95</sup>, los adipocitos marrones expresan altos niveles de *UCP-1* y otros genes termogénicos en condiciones basales (sin estimulación) y en respuesta a activadores, mientras que los adipocitos beige expresan estos mismos genes solamente en respuesta a activadores como la exposición al frío o agonistas del receptor  $\beta$ -adrenérgico o del receptor activado por el



proliferador de peroxisoma- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ )<sup>177</sup>. Es probable que los adipocitos beige y marrones tengan acciones específicas que aún no han sido estudiadas, aunque realmente todavía está por resolver.

Originalmente, se pensó que el TAM estaba presente en los seres humanos solamente durante el período neonatal. Sin embargo, datos recientes han demostrado que los adultos conservan algunos depósitos metabólicamente activos de TAM que responden al frío y a la activación simpática del sistema nervioso. Actualmente, en humanos, el TAM se ha descrito que está localizado en depósitos de la región cervical, supraclavicular, paravertebral, mediastínica, paraaórtica y suprarenal<sup>195</sup>. También se han localizado pequeños grupos de adipocitos marrones en el interior del músculo esquelético en adultos humanos<sup>5</sup>.

Además de estar implicado en la termogénesis, estudios recientes han demostrado que el tejido marrón podría estar implicado en la liberación de triglicéridos y en la utilización de glucosa<sup>17</sup>, además de servir como fuente de adipoquinas y poseer cierta actividad inflamatoria, aunque distinta de la que tiene el TAB<sup>84</sup>.

## 2.2 Distribución del tejido adiposo blanco

El tejido adiposo blanco lo encontramos distribuido en diferentes regiones a lo largo del organismo. Según su localización podemos distinguir entre el **tejido adiposo subcutáneo (TAS)** (que puede ser anterior o posterior) y el **tejido adiposo visceral (TAV)**, distribuido alrededor del omento y las vísceras, a nivel intraabdominal. Los dos tipos de tejido son diferentes en cuanto a características metabólicas y endocrinas.

El TAV y el TAS tienen diferente capacidad para sintetizar y liberar citocinas, por ejemplo, el tejido subcutáneo secreta más LEP<sup>243</sup>, mientras que el visceral secreta más citocinas proinflamatorias<sup>135,246</sup>. El tejido visceral drena directamente al hígado a través del sistema porta y por eso existe la hipótesis de que las adipocitocinas o adipoquinas del TAV

están muy implicadas en la activación de mecanismos inmunológicos hepáticos<sup>108</sup>.

El TAV contiene más adipocitos de gran tamaño que el TAS, los adipocitos grandes son disfuncionales, más insulino-resistentes, más lipolíticos y más resistentes al efecto lipogénico de la insulina<sup>155</sup>. Por eso, el TAV es más insulino-resistente, y esto es uno de los principales factores que relaciona la adiposidad visceral con el riesgo cardiovascular<sup>77,108,98</sup>.

En la obesidad, el aumento de triglicéridos en los adipocitos debido al desequilibrio entre calorías consumidas y gastadas, se manifiesta tanto con un aumento del tamaño de los adipocitos (hipertrofia) como por un incremento del número de adipocitos (hiperplasia)<sup>196</sup>.

Aunque la obesidad es claramente un factor de riesgo para el desarrollo de la RI, se ha comprobado que hay individuos en los que a pesar de aumentar el tejido adiposo, mantienen la sensibilidad a la insulina. Se conocen actualmente como individuos metabólicamente sanos<sup>107,99</sup>. Esto sugiere que la cantidad de grasa no es absolutamente determinante en la inducción de RI<sup>89</sup>.

El TAS es el reservorio natural para el exceso de energía, pero su capacidad de almacenar lípidos es limitada. En este sentido, Vidal Puig y colaboradores, propusieron la **teoría de la expandibilidad del tejido adiposo**. El TAS se expande mediante procesos de hiperplasia e hipertrofia para hacer frente al exceso de energía. Pero cuando se sobrepasa la capacidad de almacenaje debido al excesivo aporte de nutrientes, los lípidos empiezan a acumularse en áreas fuera del TAS como el tejido adiposo visceral u otros tejidos como el hígado, el páncreas, el corazón y el músculo esquelético (Figura 3). Además, los lípidos son metabolizados por vías no oxidativas, dando lugar a lo que se conoce como lipotoxicidad<sup>89,108</sup>.

El acúmulo de lípidos fuera del tejido adiposo es perjudicial para la homeostasis metabólica y contribuye, como ya hemos comentado

previamente, al desarrollo de patologías como la RI, la DMT2, la esteatosis hepática y enfermedad cardiovascular (CV)<sup>89</sup>. Este límite de almacenamiento de lípidos puede variar de un individuo a otro y evidentemente, a mayor adiposidad la probabilidad de alcanzar el límite es mayor, lo que explica el mayor índice de RI y de DMT2 en individuos obesos.

La lipodistrofia, que podría ser considerada como opuesta a un estado de obesidad, también suele estar relacionada con RI. La lipodistrofia podría ilustrar el caso del desarrollo de RI debido a la imposibilidad de expansibilidad del tejido adiposo. En ambos casos (lipodistrofia y obesidad), la grasa se acumula de forma ectópica en hígado, músculo, célula beta pancreática, donde aparece un efecto lipotóxico que conduce a RI<sup>193,238</sup>.

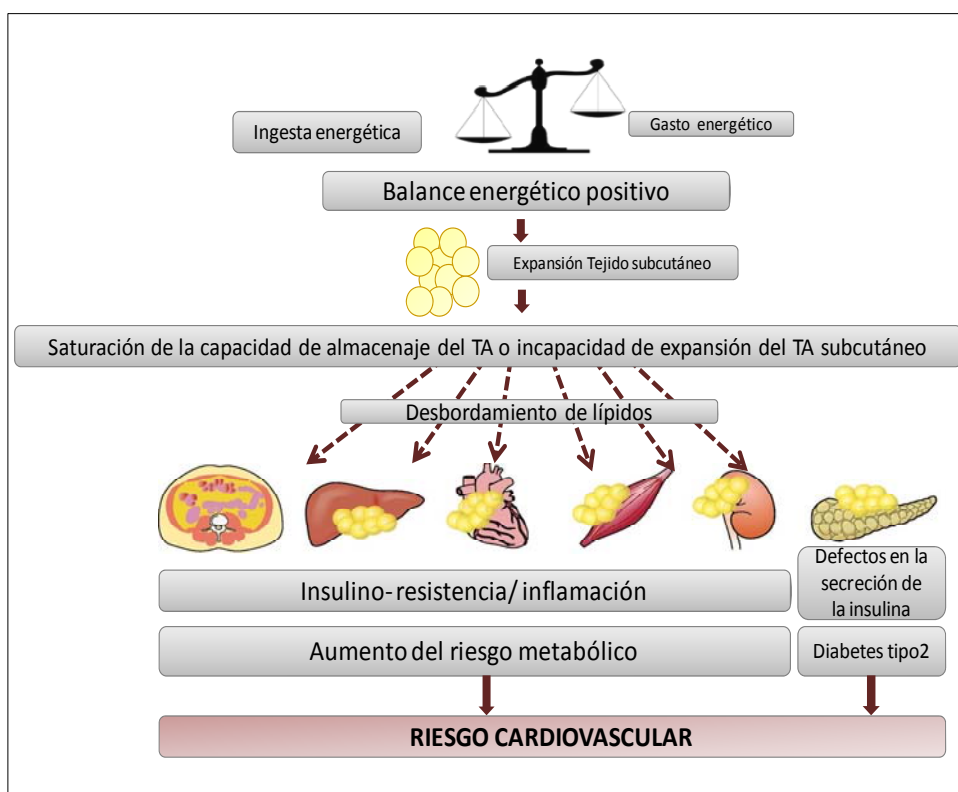


Figura 3. Consecuencias de la expansión del tejido adiposo. Modificada de Tchernof A. 2013<sup>221</sup>

### **2.3 Tejido adiposo blanco como órgano endocrino**

El tejido adiposo es verdaderamente un órgano endocrino ya que libera numerosos factores y proteínas capaces de actuar tanto de manera local como sistémica<sup>97</sup>. Estas proteínas se conocen con el nombre de adipocitocinas o adipoquinas y están implicadas en varias funciones como son la regulación del peso corporal, función vascular, función reproductiva, desarrollo de la RI y función del sistema inmune<sup>124</sup>. A través de ésta liberación de adipoquinas, el tejido adiposo establece una interrelación con otros tejidos y órganos diana como el hígado, el músculo esquelético, el sistema nervioso, el sistema CV y el páncreas, regulando así su propia función y la homeostasis metabólica.

Cuando la función endocrina del tejido adiposo se ve alterada, pueden aparecer trastornos metabólicos como la RI, DMT2 y enfermedades CV, aunque no se conocen bien los mecanismos responsables de ello<sup>190</sup>.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA CITOCINA TWEAK Y DE SU RECEPTOR Fn14 EN EL CONTEXTO DE LA OBESIDAD.

Elsa Maymó Masip

Dipòsit Legal: T 322-2016

### 3. INFLAMACIÓN Y OBESIDAD

La inflamación se define como una respuesta fisiológica del organismo a estímulos nocivos, ya sean de origen físico, químico o biológico con el fin de restablecer la homeostasis. La respuesta inflamatoria aguda consiste en el reclutamiento de componentes del plasma y leucocitos al lugar afectado y es iniciada por macrófagos y mastocitos que producen mediadores inflamatorios (citocinas, quimiocinas, eicosanoides, etc). Cuando el proceso de neutralización o de eliminación del estímulo nocivo persiste, se genera un estado de inflamación crónica<sup>134</sup>.

Aunque la relación entre inflamación y enfermedades como la obesidad y la DMT2 se puede remontar a finales de los años 1950 y 1960 cuando se encontraron niveles aumentados de fibrinógeno circulante<sup>88</sup>, la primera evidencia de inflamación en tejido adiposo obeso en humanos fue en 1995 cuando Hotamisligil y colaboradores mostraron que el tejido adiposo de los individuos obesos tenía más expresión de la citocina TNF $\alpha$  que los delgados<sup>104</sup>. A partir de entonces fueron muchos los trabajos publicados indicando que los pacientes con obesidad muestran una mayor actividad inflamatoria a diversos niveles, concretamente un incremento de factores proinflamatorios, citocinas y proteínas de fase aguda circulantes. Por ello se considera la obesidad como una enfermedad inflamatoria crónica de bajo grado que puede facilitar la aparición de RI y las comorbilidades asociadas a ésta<sup>210,102,231,4</sup>.

En este sentido se ha demostrado que los niveles circulantes de TNF $\alpha$  y de IL-6 se correlacionan directamente con la adiposidad y la RI, siendo los macrófagos infiltrantes del tejido adiposo la principal fuente de TNF $\alpha$ . Los macrófagos contribuyen aproximadamente al 50% de la IL-6 derivada de dicho tejido<sup>246</sup>.

La inflamación del tejido adiposo tiene un impacto importante en el metabolismo energético de este tejido y además puede provocar alteraciones en otros órganos como el hígado, riñón, páncreas y músculo, dando lugar a importantes alteraciones metabólicas en el organismo<sup>103</sup> (Figura 4). A pesar de todos los hallazgos y avances,

todavía no se conocen con exactitud los mecanismos que explican la conexión entre la inflamación y la obesidad.

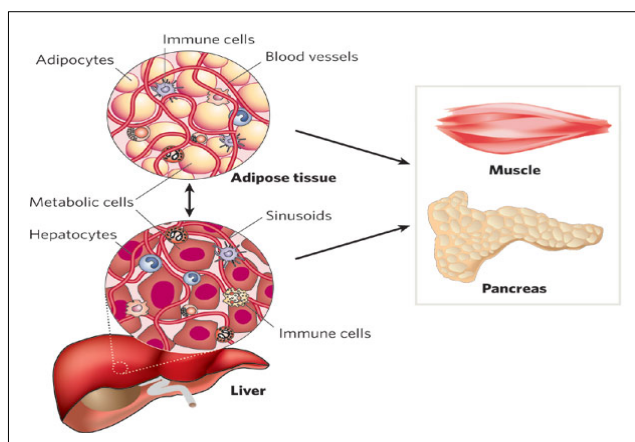


Figura 4. La inflamación del tejido adiposo provoca alteraciones en el organismo.  
Fuente: Gökhan S Hotamisligil, 2006 <sup>103</sup>

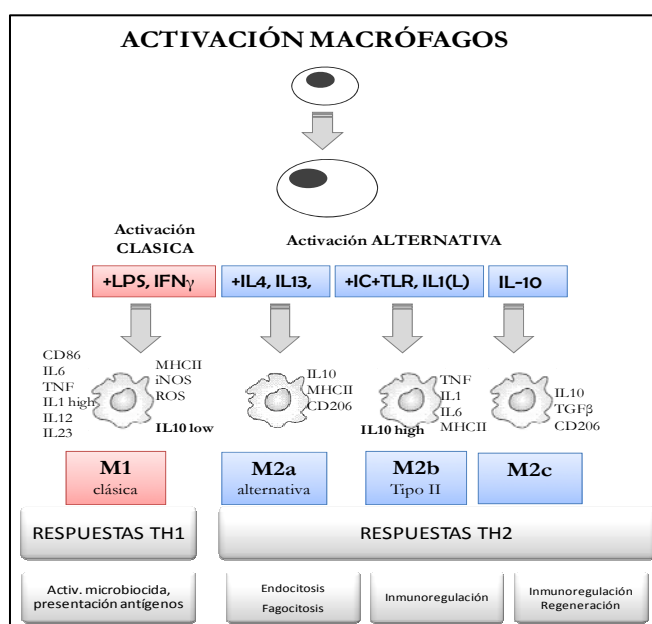
### 3.1 Macrófagos e inflamación. Polarización de macrófagos

Como hemos mencionado anteriormente, el tejido adiposo, está formado por distintos tipos celulares, entre los que se encuentran preadipocitos, células endoteliales, fibroblastos, células del sistema inmune (linfocitos, mastocitos, neutrófilos y macrófagos)<sup>246,259</sup>. El aumento de la adiposidad y el tamaño de los adipocitos están directamente relacionados con el número de macrófagos infiltrados en el tejido adiposo en la obesidad<sup>246</sup>. Este descubrimiento cambió la visión de la inflamación crónica del tejido, aunque el mecanismo por el cual el macrófago infiltra el tejido adiposo no está muy claro.

La hipótesis más aceptada es que la citocina quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1/(CCL-2), secretada principalmente por macrófagos y células endoteliales, es la responsable de la atracción de los macrófagos al tejido adiposo. El papel de MCP-1 en la infiltración de macrófagos se ha demostrado en estudios realizados en ratones *knock out*

para el *MCP-1* y en modelos de sobreexpresión de *MCP-1* en tejido adiposo<sup>121,122</sup>. A raíz de todos estos hallazgos, el macrófago se ha convertido en un nuevo marcador de la inflamación crónica y una diana potencial de fármacos insulino-sensibilizadores<sup>170</sup>.

Las células del linaje monocito-macrófago son muy heterogéneas, hecho que les proporciona una gran plasticidad y versatilidad en respuesta a señales ambientales. Aunque está aceptado que los monocitos pueden reponer los macrófagos de los tejidos especialmente durante la inflamación, se sabe que también la proliferación local células residentes formadoras de colonias pueden dar lugar directamente a la aparición de poblaciones de macrófagos maduros en el tejido. Cuando los macrófagos son reclutados por los tejidos, éstos son activados diferencialmente en respuesta a diferentes estímulos. Se ha demostrado que ciertas citocinas están implicadas en la activación y polarización de las respuestas inmunes. Así, encontramos diferentes tipos de macrófagos según su estado de activación. Con el fin de mimetizar la nomenclatura de los linfocitos T colaboradores (Th), se han clasificado los tipos de macrófagos en M1 y M2 siendo éstos los extremos de un continuo en cuanto a estados de activación<sup>37</sup>.



**Figura 5.**  
**Activación clásica y alternativa de los macrófagos.**

Adaptada y modificada de *Dall'Asta et al 2012* y *Mantovani et al 2004*.<sup>50,144</sup>



La estimulación de los macrófagos con estímulos bacterianos como el lipopolisacárido (LPS), citocinas producidas por linfocitos Th1 como el interferón  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), factores como el TNF $\alpha$  o el factor estimulante de colonias de granulocitos (GM-CSF), promueven la activación y polarización por la vía clásica hacia macrófagos de tipo M1 (Figura 5). Éstos se caracterizan por una elevada secreción de citocinas Interleucina-12 (IL-12), interleucina-23 (IL-23), óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), especies reactivas del oxígeno (ROS), expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC-II), *cluster* de diferenciación 86 (CD86), alta capacidad de presentación de antígenos y actividad microbicida<sup>85,51,50,144</sup>.

Por otro lado, citocinas antiinflamatorias como interleucinas 4 y 13 (IL-4, IL-13), glucocorticoides y la adiponectina (ADIPOQ) inducen la vía de activación alternativa que da lugar a macrófagos de tipo M2. Dentro de este grupo, Mantovani y colaboradores distinguen subtipos de macrófagos M2 según el fenotipo y el tipo de respuesta. Los M2a, inducidos con IL-4 o IL-13, presentan respuestas de tipo Th2, actividad endocítica y fagocítica. El subtipo M2b, inducido por inmunocomplejos y agonistas de receptores de tipo *Toll* (TLRs) o ligandos del receptor de la interleucina 1 (IL-1R); y los M2c, inducidos por interleucina 10 (IL-10) y hormonas glucocorticoides, con respuestas de regulación y supresión de la inflamación<sup>144</sup> (Figura 5).

Además de los fenotipos M1 y M2, también se ha descrito macrófagos reguladores (MR), que igual que los macrófagos M2, pueden producir altos niveles de IL-10; sin embargo, a diferencia de las células M2, no contribuyen a la producción de matriz extracelular<sup>164</sup>.

Los macrófagos son células versátiles, de manera que tienen la capacidad de polarizarse hacia un fenotipo u otro con el fin de ejercer efectos distintos, dependiendo del tejido y el microambiente donde se encuentran y de los precursores de monocitos de los cuales derivan<sup>51</sup>. En el tejido adiposo se encuentran distintos fenotipos de macrófagos y la proporción entre ellos contribuye a la inflamación y disfunción

metabólica de los tejidos, así como posiblemente al mantenimiento de la homeostasis.

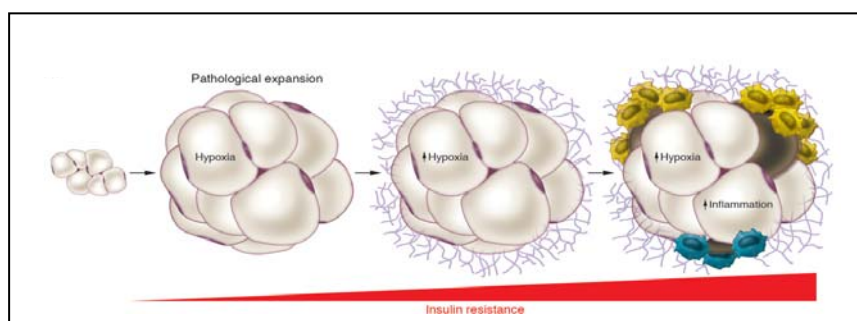
En modelos murinos todos los estudios demuestran que en el tejido adiposo de ratones obesos predomina el fenotipo M1 sobre los demás<sup>139</sup>. Sin embargo, en la obesidad humana no está claro qué población de macrófagos es más predominante en el tejido adiposo y aunque hay una mezcla de poblaciones, unos autores apuntan a que hay un predominio del fenotipo M2<sup>272</sup>; mientras que otros afirman que el fenotipo predominante es el M1<sup>56,168</sup>. Sin embargo, datos recientes apuntan a un escenario más complejo con el espectro de estados de macrófagos que va mucho más allá de la clasificación binaria M1 y M2 confundiendo aún más los datos entre humanos y modelos animales<sup>128,51,50,144</sup>.

La expansión del tejido adiposo en la obesidad, además de movilizar a los macrófagos debido a la secreción de citocinas quimio-atrayentes, también puede conducir a una gran variedad de efectos que subyacen a la inflamación en la obesidad. En este sentido, se postula que los adipocitos necróticos, que suelen aparecer en el tejido adiposo del obeso, estimulan la infiltración de los macrófagos al tejido<sup>47</sup>.

### **3.2 Hipoxia**

La hipoxia se propuso como posible causa de inflamación en 2004<sup>231</sup> aunque las evidencias experimentales que relacionan la hipoxia con el tejido adiposo no se publicaron hasta el 2007<sup>264,185</sup>.

La expansión del tejido adiposo es una característica de la obesidad. Cuando el tejido adiposo se expande y su vascularización no es suficiente para mantener la normoxia en el órgano, se pueden producir áreas localizadas de hipoxia dentro del tejido<sup>175</sup> y como consecuencia, se genera una respuesta inflamatoria local (Figura 6), característica de la obesidad y de la DMT2<sup>246</sup>.



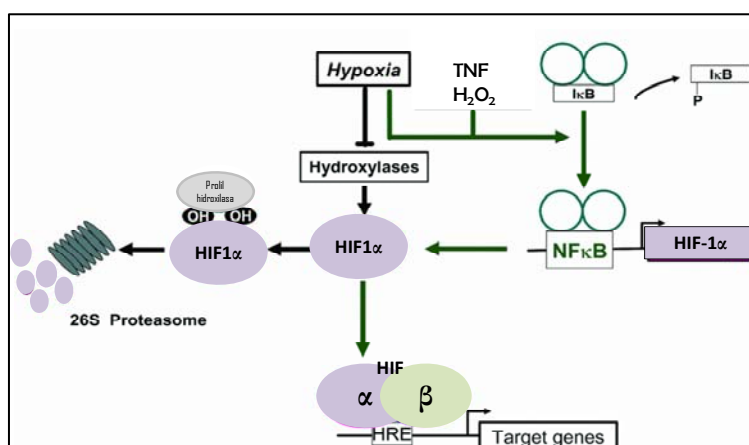
**Figura 6. Expansión patológica del tejido adiposo en la obesidad que implica hipertrofia, vascularización limitada, infiltración macrófagos e hipoxia** (Fuente: adaptada de Sun,K et al 2011) <sup>217</sup>

Como consecuencia de esta deficiencia de oxígeno (hipoxia) se induce la expresión y secreción de citocinas proinflamatorias en el tejido adiposo como la Interleucina 1 (IL-1), IL-6, LEP, Factor inducido por ayuno (FIAF o ANGPTL4), factor inhibidor de la migración de los macrófagos (MIF), inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), metaloproteinasas 2 y 9 (MMP-2 y 9), subunidad alfa del factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1 $\alpha$ ) y MCP-1<sup>230244</sup> así como de marcadores de estrés de retículo como la proteína regulada por glucosa 78 (GRP78)<sup>100</sup>. Estas citocinas atraen a monocitos al tejido adiposo, los cuales se diferencian a macrófagos, permitiendo la eliminación de células y restos de tejidos necróticos y además éstos macrófagos pueden secretar otras citocinas inflamatorias tales como TNF $\alpha$  e IL-6 empeorando así el ambiente inflamatorio<sup>247</sup>.

En la secreción de estas citocinas proinflamatorias juega un papel muy importante el **factor inducido por la hipoxia 1 (HIF-1)**. HIF-1 es un factor de transcripción que actúa como principal sensor y mediador de la respuesta a la hipoxia en el adipocito y otros tipos celulares. La estructura de HIF-1 es heterodimérica, formada por dos subunidades HIF-1 $\beta$ , que se expresa constitutivamente; y HIF1- $\alpha$  (1 o 2), que está directamente regulado por la tensión de oxígeno<sup>115</sup>. La combinación de

cualquiera de éstas con HIF-1 $\beta$  forman la unidad funcional del factor de transcripción<sup>205</sup>.

En condiciones de normoxia, HIF-1, que se sintetiza de forma constitutiva, sufre hidroxilación de un residuo de prolina y se degrada vía proteosoma (Figura 7). En cambio, en condiciones de hipoxia, las hidroxilasas no están activas y por tanto se acumula HIF-1, que pasa al núcleo y se une a elementos de respuesta a hipoxia dando lugar a la activación transcripcional de genes diana tales como *IL-6*, *LEP* y *VEGF*, entre otros<sup>230</sup>.

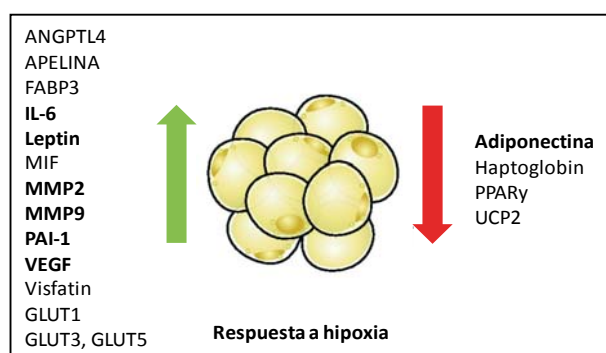


**Figura 7. Implicación del factor de transcripción HIF-1 $\alpha$  en el adipocito en condiciones de hipoxia.** Fuente: adaptada de Görlach et al 2008<sup>86</sup>

El efecto *in vitro* de la hipoxia sobre líneas de adipocitos murinos (3T3-F442A) se demostró en el 2003 cuando se observó que los niveles de *LEP*, de *VEGF* y de metaloproteinasas estaban aumentados en 3T3-F442A en respuesta a una tensión baja de oxígeno (5%  $\text{O}_2$ )<sup>138</sup>. En adipocitos de tejido visceral de rata ya se había visto que la hipoxia induce *VEGF*<sup>273</sup>.

En 3T3-L1, la hipoxia aumenta la expresión de *PAI-1*<sup>100</sup> y de *Visfatina* (propuesto como insulino-mimético y proangiogénico)<sup>204</sup>. En estas mismas células y en adipocitos primarios, también aumenta el

transportador de glucosa 1 (*GLUT-1*), *MIF*, *MMP-9*, *PAI-1*, *TNF $\alpha$*  y *VEGF* en condiciones de hipoxia, a la vez que aumenta *HIF-1 $\alpha$* <sup>264</sup>. La *Apelina* también es sensible a la hipoxia a través de *HIF-1 $\alpha$* , tanto el ARNm como la proteína están sobre-expresados en 3T3-L1 por niveles bajos de oxígeno<sup>83</sup>. Por otro lado la expresión y secreción de ADIPOQ disminuye en situación de hipoxia tisular<sup>264</sup>.



**Figura 8. Ilustración del efecto de la hipoxia en la expresión de genes en el adipocito humano.** Fuente: adaptada de Trayhurn, 2013<sup>228</sup>

En adipocitos humanos los efectos de la hipoxia son muy similares a los de los de los modelos murinos. Los genes *LEP*, *VEGF*, *IL-6*, *PAI-1*, *MIF*, *FLAF* y *GLUT-1* entre otros se sobreexpresan en condiciones de hipoxia, mientras que la *ADIPOQ* disminuye su expresión (Figura 8). Así mismo, se ha demostrado que la transcripción de la mayoría de estos genes está regulada por el factor de transcripción HIF-1 (excepto *IL-6*, que se regula por el factor nuclear *kappa* B (NF- $\kappa$ B))<sup>244</sup>.

HIF-1 se expresa en el tejido adiposo humano, tanto en adipocitos aislados como en los macrófagos infiltrantes y su expresión está aumentada en tejido adiposo de individuos obesos<sup>34</sup>.

En líneas celulares de preadipocitos de ratón y adipocitos abdominales subcutáneos humanos se demostró que la hipoxia induce RI a través de la inhibición de la fosforilación del receptor de insulina<sup>186</sup>.

Estudios con *microarrays* indican que la hipoxia induce vías glicolíticas<sup>80,152</sup> y por tanto un aumento de la utilización de la glucosa. El transportador de glucosa 1 (GLUT1) está aumentado en hipoxia en adipocitos humanos y de ratón, tanto su ARNm<sup>100,138,204,244,264</sup>, como la proteína final<sup>256</sup>.

La hipoxia también induce la expresión de genes asociados con lipólisis<sup>152</sup>, a la vez que disminuye la captación de ácidos grasos<sup>269</sup>. Los ácidos grasos liberados podrían perturbar aún más el entorno local del tejido, o entrar en la circulación sistémica y promover RI<sup>76</sup>.

### 3.3 Estrés oxidativo

Los procesos y las vías moleculares que vinculan la inflamación y la RI en la obesidad son varios y entre ellos encontramos también el estrés oxidativo<sup>247,210</sup>.

El estrés oxidativo se produce por un desequilibrio entre la producción de radicales libres y las defensas antioxidantes del organismo, cuya función es la detoxificación de dichos radicales. Los radicales libres forman parte de las especies reactivas del oxígeno (ROS) y provienen principalmente de la mitocondria<sup>1</sup>. El estrés oxidativo juega un papel importante en el desarrollo de patologías tales como la RI y enfermedades metabólicas relacionadas<sup>22</sup>.

Unos niveles elevados de ácidos grasos conllevan un aumento en el almacenamiento de energía, mayor oxidación mitocondrial de los nutrientes y por tanto más estrés oxidativo, dando lugar a un desequilibrio entre la producción de ROS y los sistemas de defensa antioxidantes de las células<sup>14,145</sup>.

Se ha descrito que la obesidad induce estrés oxidativo sistémico, siendo los marcadores de daño oxidativo mayores cuanto mayor es el IMC<sup>178</sup>. Hay varios estudios que muestran que la obesidad induce estrés oxidativo e incremento de ROS en los adipocitos<sup>248</sup>. El exceso de

glucosa y la RI activan varios mecanismos bioquímicos que terminan aumentando la producción de ROS<sup>61,188,106</sup>.

Este aumento de ROS afecta directamente a la biología del tejido adiposo y provoca la desregulación de la expresión de citocinas como el TNF $\alpha$ , RI y finalmente diabetes asociada a obesidad o enfermedad CV<sup>78,145</sup>.

### 3.4 Estrés de retículo endoplasmático

En 2004 se describió en modelos de ratones que la obesidad también causa estrés de retículo endoplasmático (RE) y que, además, conlleva la inactivación de la cascada de señalización de la insulina<sup>172</sup>.

El correcto plegamiento de proteínas en el RE es esencial para el normal funcionamiento de la célula. Sin embargo, el entorno del RE es altamente sensible. Cuando la demanda biosintética de proteínas excede la capacidad de plegamiento del RE, se da la condición denominada estrés de RE. Debido a esto, las células eucariotas cuentan con un mecanismo de adaptación, una vía de señalización del RE al núcleo denominada respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, del inglés, *unfolded protein response*). El estrés de RE se ha observado en la obesidad. El adipocito se hipertrofia debido al aumento en el almacenamiento de lípidos y esto conlleva la pérdida o disminución de la función celular y la activación de respuestas UPR<sup>90</sup>.

En mamíferos, la señalización del UPR es iniciada por tres proteínas transmembrana residentes en el RE: la quinasa asociada a RE similar a la ARN proteína quinasa (PERK), el factor activador de la transcripción 6 (ATF-6) y la enzima con requerimiento de inositol 1 (IRE1). Las proteínas mal plegadas compiten con PERK/IRE1/ATF-6 por su unión a una proteína llamada BiP o GRP78. Tras la acumulación de proteínas mal plegadas, BiP se une preferentemente a las proteínas mal plegadas, lo que lleva a la liberación de PERK, IRE1 y ATF-6. PERK se

oligomeriza y se activa una vez liberado de BiP, y posteriormente fosforila la subunidad alfa del factor de iniciación de traducción eucariótico 2 (eIF2 $\alpha$ ). La fosforilación de eIF2 $\alpha$  resulta en la supresión de la transcripción general de ARNm y la mejora selectiva de la transcripción de genes implicados en la UPR, tales como el ARNm de ATF-4. De forma similar a PERK, IRE1 se dimeriza y se activa después de ser liberado por BiP. IRE1 activado induce la *X-box-proteína 1* (XBP-1) mediante el *splicing* de su ARNm. XBP-1 mejora la UPR mediante la regulación de la transcripción de sus genes diana. ATF-6 se libera al Golgi, donde es procesado y da lugar al factor de transcripción activo que se transloca en el núcleo e inicia la transcripción de genes diana (Figura 9A)<sup>90</sup>.

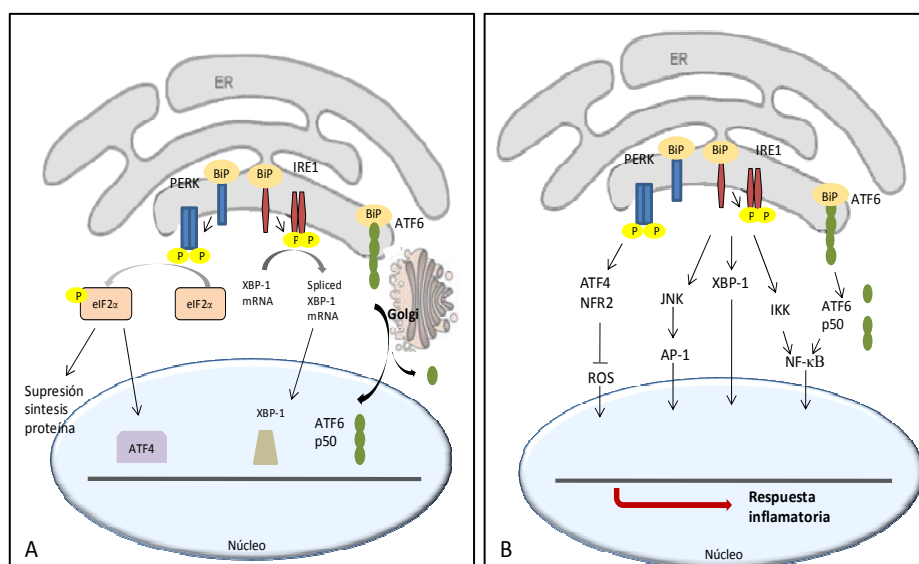


Figura 9. A) Esquema de respuesta de UPR (*Unfolded Protein Response*). B) Consecuencias del estrés del retículo endoplasmático.

Las consecuencias de la activación de UPR se relacionan con el desarrollo de RI a través de mecanismos tales como: la activación de la quinasa cJun N-terminal (JNK), del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, y del estrés oxidativo<sup>90,105</sup> (Figura 9B). Recientemente se ha descrito que en la



obesidad, el mecanismo de nitrosilación de IRE1 $\alpha$ , inducido por factores derivados de la inflamación crónica como iNOS, perjudica la actividad endonucleasa, y no permite el *splicing* de XBP1 por parte de IRE y aumenta la actividad de JNK, interfiriendo la sensibilidad a la insulina en el hígado y la homeostasis de la glucosa<sup>263</sup>.

Todos estos eventos que suceden en el tejido adiposo en situaciones de obesidad (inflamación crónica, hipoxia, estrés mitocondrial y de retículo) sumados conllevan un desequilibrio y una desregulación en la producción de una gran variedad de citocinas y factores inflamatorios que perpetúan y agravan aún más la situación patológica del tejido (Figura 10).

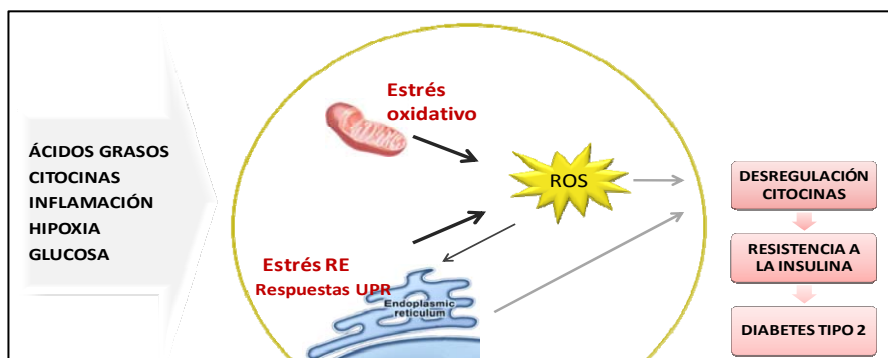


Figura 10. Estrés oxidativo y estrés de retículo endoplasmático en el adipocito.

### 3.5 Citocinas

Las citocinas son mensajeros hormonales responsables de la mayoría de los efectos biológicos en la inmunidad mediada por células. Las citocinas son secretadas por varias células implicadas en la respuesta inmune como respuesta a un estímulo y actúan sobre las células diana que expresan en su membrana receptores específicos para una citocina dada. La unión de una citocina a su receptor de membrana transmite una señal hacia el interior celular que conduce a cambios en la activación y expresión de genes. Además, en el suero se han detectado receptores

solubles para las distintas citocinas cuya acción es contribuir a la regulación de la actividad de las mismas. Las citocinas pueden actuar sobre muchos tipos celulares diferentes con acciones: a) autocrina, uniéndose a la misma célula que la secreta; b) paracrina, actuando sobre una célula cercana y c) en algunas ocasiones, con una acción endocrina uniéndose a células distantes.

Existe una creciente evidencia de la implicación funcional de múltiples citocinas pro y antiinflamatorias en la homeostasis del tejido adiposo en la obesidad. Las numerosas citocinas pueden dividirse funcionalmente en dos grupos, aquellas que son antiinflamatorias (ADIPOQ, IL-4, IL-13, antagonista del receptor IL-1 (IL-1a)) y las que son proinflamatorias, tales como IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$ . La interacción entre citocinas pro y antiinflamatorias influye significativamente en el resultado de la respuesta inflamatoria global y en la función de las células inmunes y los adipocitos *in vivo*<sup>231,96</sup>. La regulación de la secreción de citocinas en el tejido adiposo juega un papel muy importante en el desarrollo de patologías metabólicas como el síndrome metabólico, DMT2 y la enfermedad coronaria.

Las citocinas son producidas fundamentalmente por los linfocitos y los macrófagos activados, aunque también pueden ser producidas por leucocitos polimorfonucleares, células endoteliales, epiteliales, adipocitos y células del tejido conjuntivo. Según la célula que las produzca se denominan linfocinas (linfocito), monocinas (monocitos, precursores de los macrófagos), adipoquinas (células adiposas o adipocitos) o interleucinas (células hematopoyéticas). Su acción fundamental es en la regulación del mecanismo de la inflamación.

A continuación se muestran dos tablas (tabla 2 y tabla 3) donde se describen las citocinas y adipoquinas más estudiadas hasta la fecha y que se encuentran alteradas en la obesidad y/ o la DMT2.

**Tabla 2. Adipoquinas y/o citocinas aumentadas en la obesidad y/o la DMT2.** Fuente: Adaptada de Makki et. al. 2013 <sup>143</sup>

Adipoquina/ citocina	Distribución y secreción	Función	Aumento de los niveles circulantes en obesidad
<b>Leptina</b>	Secretada por TAB, hipotálamo, epitelio gástrico, placenta y gónadas	Regula ingesta y gasto energético. Regula almacenamiento grasa y señalización insulina	Ratones y humanos obesos (correlación con IMC)
<b>Resistina</b>	En roedores, secretada por los adipocitos. Humanos, secretada por macrófagos y monocitos y TAB	Metabolismo glucosa, neogluconeogénesis y RI en roedores. Pro-inflamatorio en humanos	Ratones y humanos obesos. Correlación con IR y DM
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Macrófagos y adipocitos	Metabolismo de la glucosa e insulina. Provoca IR y estimula lipólisis.	Ratones y humanos obesos (correlación IMC)
<b>IL-6</b>	Adipocitos, macrófagos, músculo esquelético, células endoteliales y fibroblastos	Metabolismo de la glucosa. Papel controvertido en IR	Humanos obesos. Correlación positiva con adiposidad. Aumentado en plasma de DMT2
<b>IL-7</b>	Células del estroma y del endotelio vascular	Homeostasis sistema inmune. Regula peso corporal, masa grasa y señalización insulina	Aumentada en obesos mórbidos
<b>IL-8</b>	Adipocitos y macrófagos	Quimiotaxis de neutrófilos	Relacionado con masa grasa y niveles TNF $\alpha$
<b>IL-1</b>	Adipocitos y macrófagos	Quimiotaxis macrófagos y termogénesis	Ratones obesos, correlación con IMC e IR
<b>RBP4</b>	Adipocitos, macrófagos y hepatocitos	Afecta la sensibilidad a la insulina, producción glucosa hepática y señalización insulina en músculo	Niveles aumentados en obesos. Correlación con IMC e IR
<b>MCP-1</b>	Tejido adiposo	Reclutamiento de macrófagos en TAB. Inflamación. Afecta la sensibilidad a la insulina.	Aumentado en modelos de ratones obesos y pacientes con DMT2
<b>PAI-1</b>	Tejido adiposo blanco	Inhibidor de la vía fibrinolítica	Aumentado en humanos obesos y DMT2
<b>CXCL5</b>	Macrófagos de la fracción estroma vascular	Interfiere con la señalización de la insulina en músculo	Niveles elevados en individuos obesos y disminuyen tras dieta baja en calorías
<b>Visfatina</b>	Hígado, músculo, TAB, médula ósea, linfocitos	Secreción y sensibilidad a la insulina. Propiedades inflamatorias	Relacionado con adiposidad visceral en humanos

<b>Chemerina</b>	TAB y placenta	Desarrollo del adipocito y función metabólica	Obesos y DMT2
<b>Vaspina</b>	TAB, hipotálamo, islotes pancreáticos, piel	Mejora sensibilidad insulina	Aumentado en obesidad y DMT2

**Tabla 3. Adipoquinas y/o citocinas disminuidas en la obesidad y/o la DMT2.** Fuente: Adaptada de Makki et. al. 2013<sup>143</sup>

<b>Adipoquina/ citocina</b>	<b>Distribución y secreción</b>	<b>Función</b>	<b>Disminución de los niveles circulantes en obesidad</b>
<b>Adiponectina</b>	Solo tejido adiposo	Insulinosensibilizador. Mejora RI y metabolismo glucosa	Disminuido en obesidad. Correlación negativa con IMC. Aumenta tras pérdida de peso.
<b>IL-10</b>	Monocitos, macrófagos, células dendríticas, células B y T	Mejora sensibilidad insulina y transporte glucosa	Atenuado en DMT2. Aumenta con pérdida peso
<b>Omentina</b>	TAB, corazón, pulmones, ovario y placenta.	Mejora captación glucosa en adipocitos humanos. Efecto anti-inflamatorio	Niveles bajos en individuos obesos, DMT2 e intolerantes a glucosa

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA CITOCINA TWEAK Y DE SU RECEPTOR Fn14 EN EL CONTEXTO DE LA OBESIDAD.

Elsa Maymó Masip

Dipòsit Legal: T 322-2016

## 4. Tumor Necrosis Factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK)

### 4.1 Identificación

El inductor débil de apoptosis parecido al TNF (TWEAK) es una citocina de la familia del TNF descrita por Chicheportiche en 1997 (Figura 11). Su gen se clonó a partir de una librería de ADNc de macrófagos e inmediatamente identificado como miembro de la superfamilia del TNF por la homología estructural que presentan los dominios que conforman la proteína. Se le llamó en inglés *weak inducer of apoptosis* porque presentaba actividad proapoptótica débil *in vitro* sobre células de carcinoma de colon humano HT-29 tratadas con IFN $\gamma$ <sup>42</sup>. En 1998, Marsters y colaboradores, buscando secuencias relacionadas con el TNF $\alpha$ , aislaron la misma proteína que Chicheportiche, y la llamaron ligando de la apoproteína 3 (APO3L)<sup>146</sup>.

A TWEAK también se le conoce como TNFSF12, APO3L, o CD255, aunque el símbolo aprobado por el comité de nomenclatura *Gene HUGO* es TNFSF12.

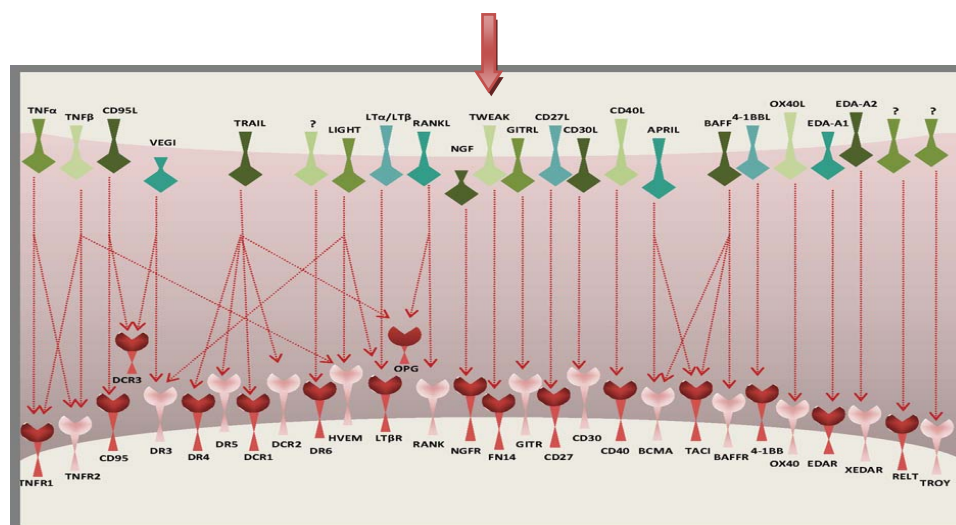


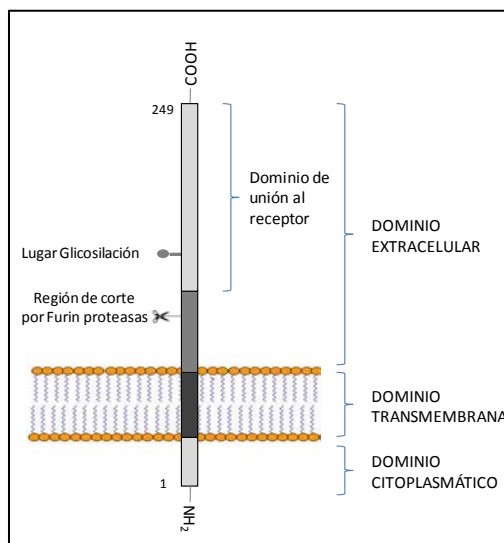
Figura 11. Proteínas de la superfamilia del TNF <sup>13</sup>

## 4.2 Estructura

El gen de *TWEAK* humano se localiza en la posición cromosómica 17p13.3 y codifica una proteína de 249 aminoácidos (27 kDa). La secuencia de aminoácidos de la molécula de *TWEAK* en humano y en ratón presentan un 93% de similitud en la región extracelular de unión al receptor<sup>42</sup>.

*TWEAK*, como la mayoría de las proteínas de la familia del TNF, adopta una conformación de proteína transmembrana de tipo II. Como tal, consta de tres dominios, uno hidrofóbico que atraviesa la membrana y dos hidrofílicos, uno en cada lado de la membrana. La región C-terminal es extracelular y consta de 206 aminoácidos con un dominio homólogo a la citocina TNF $\alpha$  que contiene un lugar de glicosilación y una región de corte. El dominio transmembrana tiene 25 aminoácidos y el dominio N-terminal intracelular, con 18 aminoácidos, contiene un lugar potencialmente fosforilable por una proteína quinasa C (Figura 12).

La isoforma *TWEAK* que se une a la membrana (m*TWEAK*) tiene un tamaño entre 30 y 35 kDa<sup>42,255</sup>. Puede ser procesada proteolíticamente en la Arginina 93 y 105 del dominio extracelular por una furina, siendo la Arginina 93 el residuo más frecuente de corte y dando lugar a una isoforma soluble (s*TWEAK*) de 156 aminoácidos (18 kDa)<sup>30</sup>.



**Figura 12. Estructura de TWEAK**  
Fuente: Adaptada de *Winkles, 2008*

### 4.3 Expresión

El ARNm de *TWEAK* se expresa en la mayoría de órganos humanos, siendo su expresión más abundante en corazón, páncreas, colon, intestino delgado, pulmón, ovario, próstata, bazo, nódulos linfáticos, apéndice y linfocitos de sangre periférica. Así mismo, también se ha descrito una expresión menor en riñón, testículo, hígado, timo y médula ósea<sup>42</sup>. Además, *TWEAK* se encuentra también expresado en células endoteliales humanas, células musculares lisas<sup>31</sup> y astrocitos humanos<sup>55,265</sup>. Hoy sabemos que *TWEAK* también se expresa en el tejido adiposo humano como ya describió nuestro grupo, tanto en los adipocitos como en la FSV<sup>36</sup>.

No existe demasiada información sobre la regulación de la expresión de *TWEAK*. Se ha descrito que los niveles de ARNm de *TWEAK* disminuyen tras la inyección de LPS en varios tejidos de ratón (riñón, corazón, pulmón) y en macrófagos; algunos datos de la literatura sugieren que también están reducidos en patologías con inflamación crónica<sup>43</sup>.

En situaciones de daño tisular o hipoxia, se induce la expresión de *TWEAK* y se ha visto que el factor de transcripción con dominio *forkhead* 3 (FOXO3A), regulado por la hipoxia y el IFN $\gamma$  están implicados en la regulación de la expresión de *TWEAK* en ratón<sup>18</sup>.

En humanos, la proteína m*TWEAK* se ha localizado por la técnica de separación celular con activación de fluorescencia (*FACS*), en diversos tipos celulares como la superficie de monocitos, células dendríticas, células *Natural Killer* estimuladas con IFN $\gamma$ <sup>70,141,166</sup>, en monocitos derivados de pacientes con esclerosis múltiple<sup>54</sup>, en adenocarcinoma de colon, en hepatocarcinoma<sup>123</sup> y en líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-436 y MDA-MB-231)<sup>253</sup>.



## 4.4 Receptores de TWEAK

Se han descrito dos receptores para TWEAK.

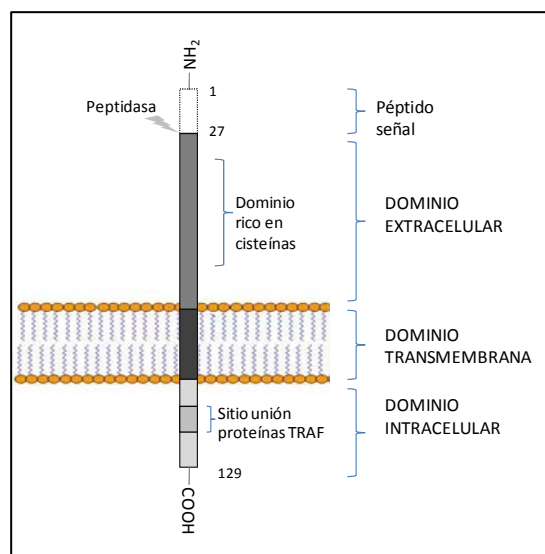
### 4.4.1 *Fibroblast growth factor-inducible 14 (Fn14)*

**Fn14** es el primer receptor que se describió de TWEAK. Se identificó de una librería de células endoteliales de vena umbilical humana en 2001<sup>251</sup>.

A Fn14 también se le denomina TNFRSF12A (comité de nomenclatura *Gene* HUGO) o TWEAK-R y es el receptor transductor de señal de TWEAK. El gen *Fn14* se localiza en el cromosoma 16p13.3 y codifica una proteína transmembrana de tipo I, ya que el dominio N-terminal se encuentra orientado hacia el exterior y el C-terminal está en el citoplasma. Su tamaño es de 129 aminoácidos y se corresponde con un peso molecular de cerca de 14 kDa. Presenta solamente un dominio rico en cisteínas en la región extracelular y en el extremo amino terminal contiene un péptido señal de 27-29 aminoácidos, seguido de un lugar de escisión proteolítico que da lugar a una proteína de 102 aminoácidos, siendo el receptor más pequeño de la superfamilia de receptores del TNF $\alpha$  (TNFRSF)<sup>252</sup> (Figura 13).

La región citoplasmática de Fn14 no contiene dominio de apoptosis pero sí tiene un supuesto lugar de unión a proteínas TRAF<sup>31</sup>. Las proteínas TRAF, del inglés *TNFR-associated factors*, son una familia de proteínas adaptadoras que se asocian a receptores de la familia del TNF $\alpha$ . El reclutamiento de una o varias de ellas da lugar a la activación de vías de señalización implicadas generalmente en procesos de proliferación y supervivencia<sup>110</sup>. Hasta el momento se conocen seis miembros pertenecientes a esta familia de proteínas TRAF. Se ha visto que el receptor Fn14 es capaz de unir algunas de ellas, concretamente TRAF1, TRAF2, TRAF3 y TRAF5. El sitio de unión a TRAFs está flanqueado por dos residuos de Treonina que son los únicos lugares posibles de fosforilación del receptor<sup>252</sup>.

La secuencia de la proteína madura en humano y en ratón mantiene una homología del 90%.



**Figura 13. Estructura de Fn14.**  
Adaptada de *Winkles 2008* <sup>255</sup>

*Fn14* tiene una expresión casi ubicua. Se localiza en células epiteliales<sup>153</sup>, mesenquimales<sup>82,176</sup> y endoteliales<sup>251</sup>, también en células progenitoras de neuronas<sup>93</sup>, las propias neuronas<sup>220,181</sup> y astrocitos del sistema nervioso<sup>54</sup>, en hígado<sup>112</sup>, células madre embrionarias de ratón<sup>184</sup> y eritrocitos inmaduros<sup>70</sup>. No se ha detectado expresión en linfocitos B y T<sup>33</sup>.

Fn14 es un receptor altamente inducible por factores de crecimiento, citocinas y otros estímulos. La región promotora del gen *Fn14* tiene varios lugares de unión a factores de transcripción como la proteína activadora 1 (AP-1) o NF-κB, aunque no se han descrito aún los elementos reguladores del promotor implicados en su activación<sup>255</sup>.

Mientras que los niveles de expresión de *Fn14* son relativamente bajos en la mayoría de tejidos sanos, éstos aumentan en situaciones de daño tisular agudo<sup>251,70</sup>, en modelos de enfermedad inflamatoria crónica como artritis reumatoide<sup>131</sup>, esclerosis múltiple<sup>207</sup>, enfermedades hepáticas inflamatorias<sup>112</sup> y patologías inflamatorias intestinales<sup>59</sup>. Adicionalmente, también se han encontrado niveles de expresión elevados de mensajero y de proteína Fn14 en células invasivas de glioma *in vitro* e *in vivo*<sup>227</sup>.

Como ocurre con otros miembros de la superfamilia de receptores del TNF, a nivel postraduccional se ha demostrado muy recientemente que tras la unión del ligando con su receptor, Fn14 es internalizado y degradado, pero este recambio de la proteína también ocurre de forma constitutiva e independiente de TWEAK<sup>91</sup> (Figura 14).

#### 4.4.2 *Cluster of Differentiation 163 (CD163)*

Se ha descrito que sTWEAK también puede unirse a CD163<sup>28</sup>. Un estudio en la línea de monocitos humanos THP-1 demuestra que la interacción TWEAK-CD163 interfiere en la unión de TWEAK a Fn14 provocando la internalización de dichos complejos y retirando de la circulación a sTWEAK<sup>161</sup> (Figura 14).

La unión de sTWEAK a CD163 parece actuar como un mecanismo antagonista, pero su relevancia *in vivo* no está clara ya que la interacción sTWEAK-CD163 no ha podido ser confirmada en otros estudios<sup>202,74</sup>.

CD163 es una proteína transmembrana de tipo I que pertenece a la familia de receptores *scavenger* ricos en cisteínas (SRCR). Contiene 9 dominios SRCR de tipo B unidos a un segmento corto transmembrana y una cola citoplasmática que puede sufrir *splicing* y dar como resultado diferentes isoformas de la proteína con diferentes longitudes en el dominio intracelular<sup>87</sup>. A partir del corte proteolítico de CD163 en la superficie celular, se genera la forma soluble de CD163 (sCD163)<sup>157</sup>. sCD163 se encuentra de forma constitutiva en el plasma sanguíneo humano<sup>159</sup>. CD163 se expresa de forma casi exclusiva en monocitos y macrófagos y se ha descrito que su principal función es la captación de complejos haptoglobina-hemoglobina circulantes<sup>130</sup>, aunque también tiene funciones relacionadas con la adhesión de los eritroblastos<sup>69</sup> y la detección inmunológica de bacterias<sup>68</sup>.

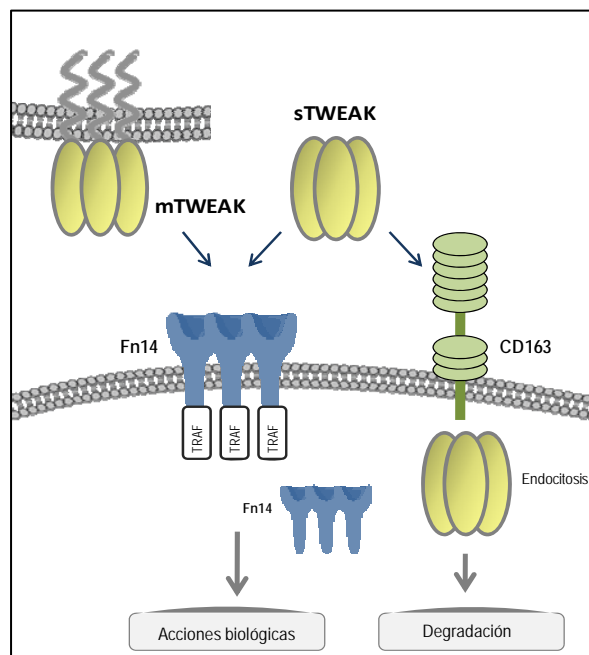


Figura 14. Unión de sTWEAK y mTWEAK a sus receptores.

#### 4.5 sTWEAK y sCD163 como biomarcadores

Como se ha descrito anteriormente, mediante un corte proteolítico, se genera la forma soluble de la proteína TWEAK (sTWEAK). La primera evidencia de que sTWEAK podía ser considerado como un biomarcador CV partió de la observación de niveles reducidos de sTWEAK en el plasma de pacientes con aterosclerosis carotídea en comparación con sujetos sanos<sup>24</sup>. La asociación de concentraciones plasmáticas de sTWEAK con marcadores de aterosclerosis (disfunción endotelial y grosor de la capa íntima) llevó a proponer sTWEAK como un biomarcador independiente de riesgo CV. Los niveles sTWEAK se encuentran reducidos en otras enfermedades CV, como la enfermedad arterial periférica, enfermedad arterial coronaria<sup>114,160</sup>, hipertensión pulmonar arterial<sup>75</sup>, insuficiencia cardíaca<sup>46,187</sup>, aneurismas aórticos abdominales<sup>148</sup> y enfermedad renal crónica<sup>234,266,267</sup>.

Sin embargo, en pacientes con infarto de miocardio o infarto cerebral agudos, los niveles de sTWEAK son más altos, pero se normalizan a las pocas horas de hospitalización<sup>45</sup>.

Los niveles de sTWEAK en circulación también se han hallado asociados negativamente con los niveles de glucosa, hemoglobina glicosilada (HbA<sub>1c</sub>), el HOMA-IR y la obesidad central, todos ellos conocidos factores de riesgo CV<sup>129,268,137</sup>. Esto refuerza la hipótesis de que la asociación de los niveles bajos de sTWEAK con un perfil CV alterado va más allá que la de una simple asociación casual.

Recientemente, un estudio realizado en una población de alto riesgo CV ha destacado la importancia de sTWEAK como marcador predictivo de la DMT2. Los sujetos que desarrollaron DMT2 muestran niveles más bajos en suero de sTWEAK que los controles, y esta disminución se asocia con un mayor riesgo de DMT2 de manera significativa e independiente<sup>58</sup>. Estos resultados y otros estudios anteriores<sup>129</sup> refuerzan el papel patogénico que potencialmente podría tener sTWEAK en la patogénesis de la DMT2.

En trabajos previos publicados por nuestro grupo de investigación se ha descrito que los pacientes con diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) presentan niveles reducidos de sTWEAK asociados a marcadores de aterosclerosis precoz (disfunción endotelial y espesor íntima-media), hecho que ha llevado a proponer sTWEAK como un biomarcador independiente de enfermedad CV<sup>137</sup> en esta población.

Contrariamente a los datos publicados sobre niveles de sTWEAK circulantes en enfermedades de riesgo CV<sup>23</sup>, se han descrito niveles séricos de sTWEAK elevados en enfermedades reumáticas de carácter autoinmune como el lupus eritematoso<sup>245</sup>, la artritis reumatoide<sup>176</sup>, la esclerosis sistémica<sup>262</sup> y la esclerosis psoriática<sup>258</sup> entre otras. TWEAK parece jugar un papel importante en la fisiopatología de estas enfermedades y los primeros ensayos clínicos basados en anticuerpos anti-TWEAK para reducir los efectos inflamatorios en estas patologías ya se están llevando a cabo<sup>20</sup>. Sin embargo, los mecanismos y el

significado que conducen a la elevación de los niveles de sTWEAK en estos contextos aún no se han dilucidado.

En cuanto a los niveles de sCD163, en situaciones de daño agudo como por ejemplo sepsis o fallo hepático agudo, se ha relacionado los niveles muy bajos de sCD163 con un mejor pronóstico de la enfermedad<sup>158</sup>. En enfermedades crónicas como artritis reumatoide<sup>150,16</sup>, tuberculosis<sup>126</sup>, enfermedad renal crónica<sup>15</sup> y obesidad<sup>15,208</sup>, los niveles moderadamente elevados son indicadores de morbilidad y mortalidad. Es por ello que se ha propuesto sCD163 como un biomarcador de la activación de la respuesta inmune en varios tejidos<sup>157</sup>.

Se han encontrado niveles más altos de sCD163 en plasma de individuos obesos y con diabetes<sup>214</sup>. También se relacionan los niveles altos de sCD163 con la masa grasa en pacientes con enfermedad renal crónica y complicaciones metabólicas<sup>15</sup>. Niveles elevados de sCD163 se han asociado con RI<sup>174,270</sup> y con la obesidad<sup>2</sup>.

Los niveles de sTWEAK y de sCD163 y la relación entre ambos también se han utilizado como biomarcadores en el contexto de algunas enfermedades con riesgo CV, concretamente se ha descrito que los niveles de sCD163 se correlacionan negativamente con los niveles plasmáticos de sTWEAK<sup>162</sup> y el cociente sCD163/sTWEAK se asocia con aterotrombosis en enfermedad arterial periférica<sup>160</sup>. También en esta misma patología, los niveles de sTWEAK bajos y el cociente sCD163/sTWEAK elevado están estrechamente relacionados con un incremento de la mortalidad<sup>232</sup>. Estudios recientes indican también una relación entre los niveles de sCD163 y sTWEAK y la esclerosis sistémica, concretamente el cociente sCD163/sTWEAK es mayor en pacientes con la enfermedad comparado con sujetos sanos<sup>127</sup>.

En el contexto de la DMT2, el cociente sCD163/sTWEAK es mayor en pacientes diabéticos, ya que tienen menos sTWEAK circulante y los niveles de sCD163 no varían. También se observa que dicho cociente es significativamente mayor en hombres que en mujeres, en pacientes con

síndrome metabólico y en pacientes con alteraciones en los niveles glucémicos no diagnósticos de DMT2<sup>58</sup>.

#### 4.6 Señalización de TWEAK

TWEAK y Fn14 son moléculas altamente conservadas en la evolución, lo que nos lleva a pensar que ejercen una función biológica importante en el organismo. La región C-terminal de TWEAK es la responsable de la trimerización y la consecuente unión al receptor, por lo que tanto sTWEAK como mTWEAK son capaces de interactuar con el receptor y desencadenar la ruta de señalización, siendo así ambas formas biológicamente activas<sup>33</sup> (Figura 15). Tanto la forma soluble como la unida a membrana se pueden expresar de forma simultánea en la misma célula<sup>30</sup>.

La unión tanto de sTWEAK como mTWEAK a su receptor Fn14 provoca la formación de trímeros que mediante la unión de los dominios citoplasmáticos a proteínas adaptadoras TRAF, darán lugar a la activación de vías de señalización, principalmente las vías canónica y no canónica de NF- $\kappa$ B y vía de las mitógeno quininas (MAPK).

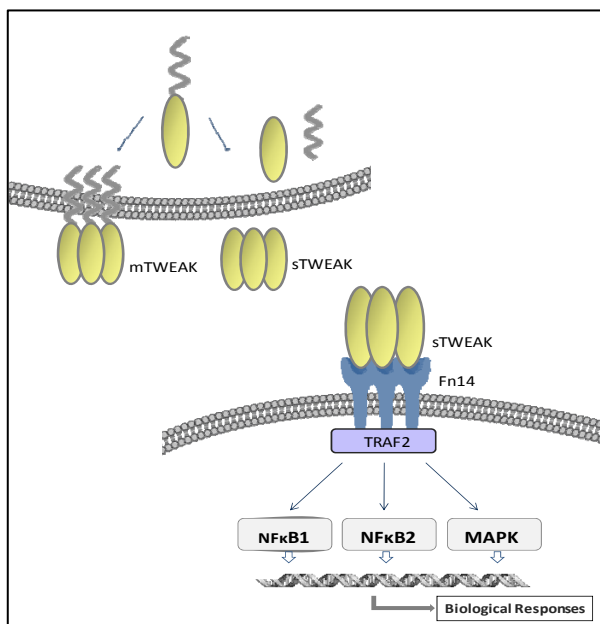


Figura 15. Vías más frecuentes de señalización de TWEAK al unirse a Fn14.

Existen varias vías de señalización que dan lugar a la activación del NF- $\kappa$ B, la vía clásica o canónica y la alternativa o no-canónica que son distintas en cuanto a estímulos que las activan, complejos y respuesta celular<sup>7,133</sup>.

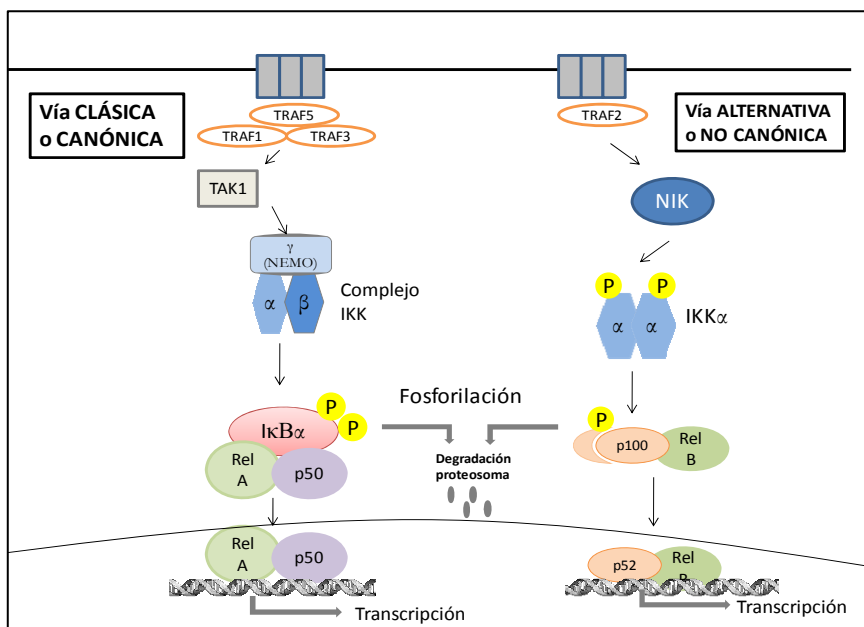
El factor de transcripción NF- $\kappa$ B controla la transcripción de citocinas proinflamatorias tales como *TNF $\alpha$* , *IL-1* e *IL-6*<sup>237,118</sup>, de mediadores inflamatorios como iNOS y moléculas de adhesión celular<sup>183</sup>.

Los miembros de la familia del factor de transcripción NF- $\kappa$ B consisten en homo o heterodímeros, miembros de la familia de proteínas Rel y son activados a través de la vía clásica (o canónica) o la vía alternativa (no canónica). En mamíferos las proteínas caracterizadas hasta la fecha que forman parte de esta familia son: NF- $\kappa$ B1 (sintetizada como precursor p105 y luego p50), NF- $\kappa$ B2 (sintetizado como p100 y luego p52), RelA (p65), RelB, y c-Rel, todas ellas con un dominio homólogo en la región N-terminal (dominio RHD, de *Rel homology domain*) que les permite la formación de dímeros<sup>7</sup>, la unión al ADN y la interacción con la molécula inhibidora I $\kappa$ B.

La **vía clásica de activación** depende de la activación del complejo de quinasas que fosforilan I $\kappa$ B (IKK) y la actividad de NF- $\kappa$ B se regula mediante la interacción de proteínas inhibitorias (I $\kappa$ B) que retienen el complejo p50/RelA en el citoplasma. Se conocen dos isoformas de las proteínas inhibitorias I $\kappa$ B: I $\kappa$ B $\alpha$  y I $\kappa$ B $\beta$ , siendo la primera la más conocida. Cuando las células reciben señales extracelulares como el TNF $\alpha$ , LPS o la falta de oxígeno, mediante el reclutamiento de moléculas TRAF, se activa el complejo IKK, que está formado por IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  y NEMO (IKK $\gamma$ ). No se conoce con exactitud cómo transcurre la activación de dicho complejo pero una de las proteínas implicadas es la quinasa activada por el factor de crecimiento transformable beta (TAK1). La activación de IKK conlleva la fosforilación, ubiquitinización y degradación vía proteosoma de I $\kappa$ B $\alpha$  (que mantenía inhibido el complejo) y la maduración de p105 en p50. Una vez liberado del inhibidor, RelA y p50 migran al núcleo y se inicia la transcripción de genes diana como *TNF $\alpha$* , *IL-1* e *IL-6*<sup>7</sup> (Figura 16).



**La vía alternativa** es independiente de IκB, conlleva la activación final del complejo RelB/p52<sup>7</sup> y es activada por estímulos distintos como linfotoxina b (LT b), ligando de CD40 (CD40L)<sup>206</sup>, factor activador de células B (BAFF), ligando de receptor activador para el factor nuclear kappa B (RANKL) y miembro 11 de la superfamilia del TNF (TNFSF11)<sup>167</sup>, pero no por TNFα<sup>149,52,26</sup>. La vía alternativa depende de la activación de dímeros IKK a través de la quinasa inductora de NF-κB (NIK)<sup>111</sup>. La activación de esta quinasa conlleva la fosforilación de IKKα que es responsable de la fosforilación de p100 que tras su procesamiento, madura a su forma activa p52. Esta se une a RelB provocando su translocación nuclear y la respuesta génica (Figura 16).



**Figura 16. Vías clásica (canónica) y alternativa (no canónica) de activación de NFκB.**

El reclutamiento de proteínas TRAF-1, 2, 3 y 5 da lugar a la activación de diferentes quinasas como *transforming growth factor b-activated kinase1* (TAK1) y NF-κB inducing kinase (NIK). TAK1 activa IKKβ y NIK activa IKKα, dando lugar a la activación de las vías canónica y no canónica respectivamente. La activación de NF-κB da lugar a la transcripción de genes responsables de las respuestas biológicas.

Se ha demostrado que TWEAK es capaz de activar la vía de las MAPK a través de la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK); JNK, implicada en la activación del factor de transcripción AP-1; o p38 MAPK en varias líneas celulares como monocitos THP-1, células endoteliales y fibroblastos<sup>23,32,30,60,235</sup>. También hay evidencias de la activación de NF- $\kappa$ B por parte de TWEAK a través de la quinasa activada TAK<sup>132</sup> y de NIK<sup>41,215</sup>.

TWEAK puede dar lugar a la activación de unas vías u otras según el contexto y del tipo de isoforma. La forma sTWEAK activa preferentemente la vía no canónica de NF- $\kappa$ B y débilmente activa la vía canónica, mientras mTWEAK es capaz de estimular ambas vías con la misma intensidad en líneas celulares de adenocarcinoma (HT29), cáncer de cérvix (HeLa-TNFR2) y fibrosarcoma (HT1080) humanos<sup>191</sup>.

Más recientemente se ha visto que TWEAK también podría desencadenar la activación de otras vías como la fosfoinositol 3 quinasa/Akt (PI3K/Akt)<sup>9</sup> y guanosinas trifosfatasa (GTPasas) de la familia Rho<sup>242</sup>.

En 2008, Winkles y colaboradores hipotetizaron dos modelos de interacción TWEAK-Fn14. Por un lado, la interacción dependiente de ligando, que implica grandes concentraciones de trímeros de TWEAK que se unen a trímeros de Fn14 en bajas concentraciones; y por otro lado, la interacción independiente del ligando cuando la concentración de TWEAK es menor que la de su receptor Fn14. En este último caso, los receptores libres trimerizan y activan señalización intracelular<sup>255</sup>. Este mecanismo podría ser importante en cáncer, donde hay niveles elevados de Fn14 pero niveles bajos de TWEAK<sup>226,227</sup>. Brown y colaboradores, en 2013, pudieron demostrar esta señalización del receptor Fn14 independiente de TWEAK, a partir de la construcción de una variante de Fn14 que no une TWEAK, pero que sí da lugar a la activación de la vía de NF- $\kappa$ B en células HEK393 (células humanas embrionarias de riñón)<sup>29</sup>.

La siguiente figura ilustra las distintas vías de señalización de TWEAK tal y como se muestra en la página web NetSlim, construida a partir de la recopilación de los datos existentes en la bibliografía<sup>21</sup>.

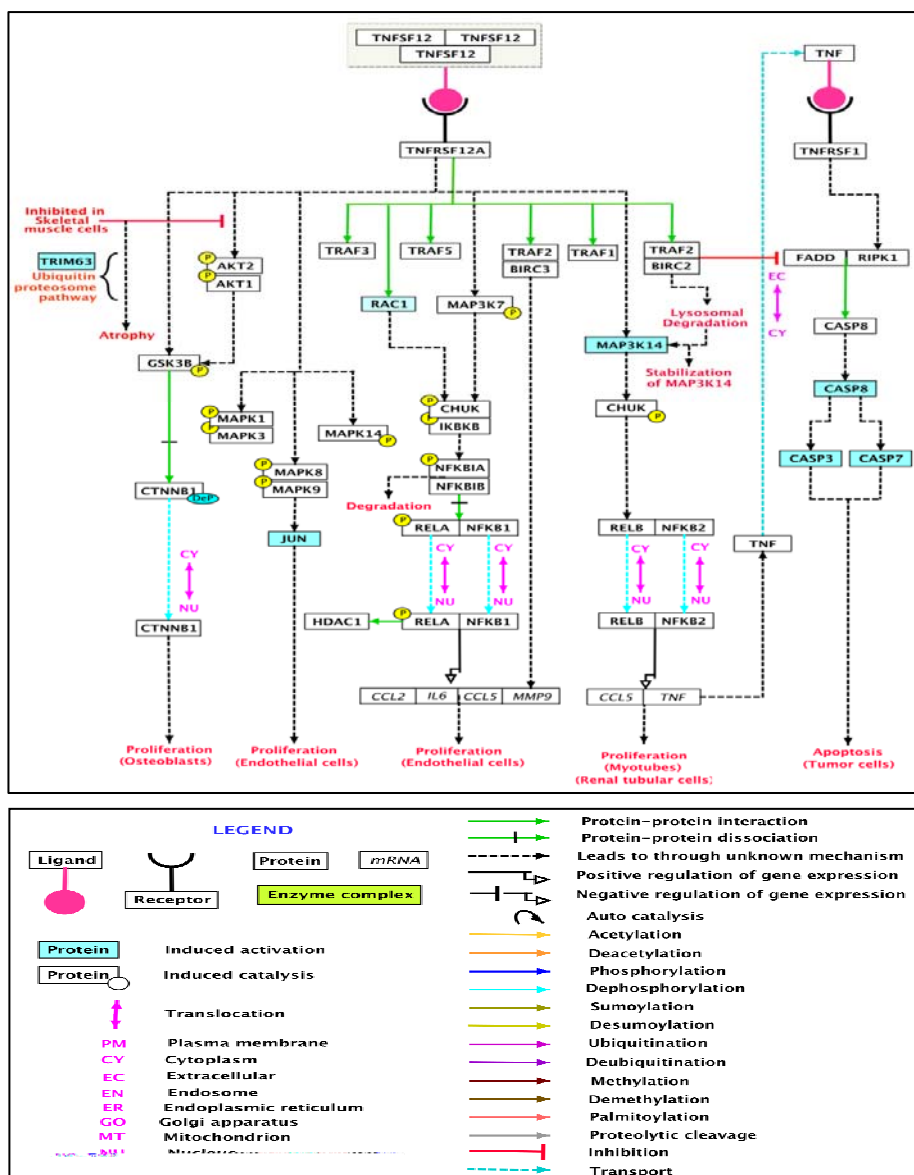


Figura 17. Vías de señalización de TWEAK. Fuente: <http://www.netpath.org/netslim/><sup>21</sup>.

## 4.7 Actividades biológicas de TWEAK

La unión de TWEAK a su receptor desencadena una serie de actividades biológicas que varían según tipo celular y contexto dónde se desencadenen.

### 4.7.1 Apoptosis

TWEAK debe su nombre a la observación inicial *in vitro* de la capacidad de inducir muerte celular en algunas líneas celulares de adenocarcinoma<sup>42</sup>. Pero la actividad proapoptótica de TWEAK es controvertida, ya que en pocos casos se ha demostrado un efecto directo. La mayoría de estudios demuestran que este efecto es indirecto, es decir, mediado por otras citocinas<sup>202,117,236</sup>. *In vivo*, no está claro que induzca apoptosis directamente, precisamente porque su receptor Fn14 no tiene dominio de muerte celular.

A pesar de que no se conocen bien los mecanismos por los cuales TWEAK podría inducir apoptosis, algunos estudios muestran que podría ser por mecanismos dependientes de contexto y del tipo celular. Esto incluye apoptosis dependiente de  $\text{TNF}\alpha$ <sup>202,236</sup>, apoptosis dependiente de caspasas<sup>109</sup> o independiente de caspasas con características de necrosis<sup>254</sup>. En este sentido, un estudio reciente muestra que TWEAK induce apoptosis a través del ensamblaje de un complejo que comprende la proteína inactivadora de ribosomas 1 (RIP1), la proteína adaptadora que contiene un dominio de muerte citosólico (FADD) y Caspasa 8<sup>109</sup>.

También hay trabajos que indican que TWEAK no es capaz de inducir apoptosis en algunos tipos celulares, concretamente en queratinocitos<sup>274</sup>, mientras que otros<sup>194</sup> muestran que TWEAK induce apoptosis en un 26-38% en líneas celulares de queratinocitos HaCaT y NHK. Este mismo estudio muestra que la muerte de las células no se debe a la secreción de  $\text{TNF}\alpha$ , ni al ligando inductor de apoptosis relacionado con  $\text{TNF}\alpha$

(TRAIL) ni a ningún otro ligando inductor de apoptosis. Tampoco a través de vías dependientes de caspasa y catepsina B, sino que TWEAK induce arresto en una parte del ciclo celular a través de la transcripción de factores de transcripción implicados en apoptosis como FOXO3A<sup>194</sup>.

#### 4.7.2 Actividad proinflamatoria

La capacidad inflamatoria de TWEAK se describió originariamente en células tumorales *in vitro* debido a la capacidad de inducir la producción de citocinas<sup>42</sup>. Posteriormente, también se describió que TWEAK tiene actividad proinflamatoria *in vitro* sobre otros tipos celulares humanos, tales como células de cáncer de colon, melanoma, fibrosarcoma<sup>42</sup>; en sinoviocitos y fibroblastos de la dermis<sup>44</sup>; células endoteliales<sup>94</sup>; astrocitos<sup>180,55</sup>; queratinocitos<sup>116</sup>; fibroblastos gingivales<sup>101</sup>, condrocitos<sup>176</sup> y en líneas celulares de macrófagos<sup>125</sup> entre otras.

Esta actividad proinflamatoria de TWEAK/Fn14 generalmente tiene lugar a través de la activación de las vías de señalización NF- $\kappa$ B y MAPK y se traduce en la inducción de secreción de citocinas tales como IL-6, Interleucina 8 (IL-8), MCP-1, proteína 10 inducida por IFN $\gamma$  (IP-10) y RANTES (del inglés, *regulated upon activation, normally T-expressed*)<sup>44,116,199</sup>, así como en el aumento de la producción de enzimas proteolíticas MMP-1 y MMP-9<sup>125</sup>; mediadores de inflamación como la prostaglandina E<sub>2</sub><sup>44</sup>; y moléculas de adhesión intracelular 1 (ICAM-1) y E-selectina<sup>38</sup>.

TWEAK tiene un papel en el proceso inflamatorio de algunas patologías como enfermedades del sistema nervioso central<sup>139,53,165</sup>, en lesión CV<sup>23</sup> y en enfermedades renales<sup>197</sup>, aunque todavía quedan muchos aspectos por resolver sobre la respuesta inflamatoria producida por TWEAK en este y otros contextos.

### 4.7.3 Proliferación

Hay numerosos estudios que muestran una acción directa de TWEAK sobre la proliferación en líneas celulares, por ejemplo en líneas de carcinoma hepático humano<sup>123</sup>, líneas de epitelio mamario humano<sup>153</sup>, astrocitos y sinoviocitos de ratón<sup>55,120</sup>.

Además, estudios experimentales en ratones implican directamente a TWEAK en la proliferación celular del hígado<sup>112</sup>. Y en un contexto no inflamatorio, TWEAK también induce la proliferación del epitelio tubular renal<sup>198</sup>.

### 4.7.4 Regeneración tisular

TWEAK también puede inducir crecimiento celular y regeneración en el tejido en la mayoría de los tipos celulares donde es capaz de inducir proliferación (líneas celulares de carcinoma hepático<sup>123</sup>, epitelio mamario<sup>153</sup> y en astrocitos murinos<sup>54</sup>).

A pesar de la débil expresión del receptor Fn14 en condiciones normales, se ha demostrado en ratones que TWEAK estimula la proliferación de células progenitoras ovas esenciales para la regeneración hepática a través de su receptor Fn14<sup>112</sup>. Así como también es capaz de estimular directamente procesos de mitosis en este mismo tipo de células hepáticas de ratón<sup>225</sup>.

### 4.7.5 Actividad proangiogénica

TWEAK tiene un papel en la formación de la vasculatura *in vitro* ya que ha visto que induce proliferación en una variedad de líneas celulares endoteliales humanas: células endoteliales de la vena de cordón umbilical humano (HUVEC), células endoteliales microvasculares derivadas de dermis humana (HMVEC-d), Células musculares lisas de pared vascular

(AOSMC), y fibroblastos humanos de la dermis neonatales (NHDF-neo)<sup>140,251</sup>. En el mismo sentido, TWEAK puede actuar como un factor de migración y de crecimiento endotelial y podría tener un papel regulador de la angiogénesis en situaciones patológicas<sup>60</sup>.

Jakubowski y colaboradores plantearon un doble papel para TWEAK pudiendo regular el crecimiento, el mantenimiento vascular y la remodelación tisular de manera diferencial según el contexto<sup>113</sup>.

Además, recientemente se ha observado que la ruta TWEAK/Fn14 está también activada en patologías relacionadas con la neovascularización de la retina en situaciones de isquemia inducida en ratones<sup>6</sup>.

#### 4.7.6 Diferenciación

TWEAK es capaz de estimular la diferenciación de células progenitoras favoreciendo la regeneración tisular después de daño tisular agudo. Pero en enfermedades crónicas, cuando persiste la activación de TWEAK, se ha visto que inhibe la diferenciación de las células progenitoras<sup>33</sup>, y que promueve la diferenciación de los precursores de los osteoclastos a osteoclastos maduros a través de la estimulación de RANKL en humanos y en ratón con artritis reumatoide<sup>173,9</sup>.

Por otro lado, hay un estudio donde se ha demostrado en líneas celulares y preadipocitos primarios de humanos *in vitro* que TWEAK puede inhibir la diferenciación de los preadipocitos a adipocitos maduros en los primeros días, reduciéndose la acumulación de lípidos de forma dosis dependiente<sup>223</sup>.

#### 4.7.7 Migración

Se ha demostrado que TWEAK tiene un efecto estimulador de la migración celular en células endoteliales HUVEC *in vitro*<sup>60</sup> y en células de glioma U118 y SF767<sup>226</sup>.

En células de cáncer de ovario estimuladas con TWEAK también se ha observado un aumento en la capacidad migratoria, así como que la activación de NF- $\kappa$ B y VEGF por parte de TWEAK/Fn14 podría estar implicado en la invasión del cáncer de ovario<sup>48</sup>.

En varios tipos de tumores donde se ha visto que Fn14 está aumentado, se ha descrito que este receptor tiene un papel en la migración de las células del tumor y por tanto en la invasión del cáncer<sup>40,12,226,249</sup>.

Finalmente, en un trabajo en el que participó nuestro grupo de investigación también se ha comprobado que TWEAK estimula la migración de los fibroblastos embrionarios murinos aumentando la MMP-9 a través de la activación de NF- $\kappa$ B y p38-MAPK<sup>235</sup>.



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA CITOCINA TWEAK Y DE SU RECEPTOR Fn14 EN EL CONTEXTO DE LA OBESIDAD.

Elsa Maymó Masip

Dipòsit Legal: T 322-2016

# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA CITOCINA TWEAK Y DE SU RECEPTOR Fn14 EN EL CONTEXTO DE LA OBESIDAD.

Elsa Maymó Masip

Dipòsit Legal: T 322-2016

## HIPÓTESIS

Se ha descrito que la expresión de TWEAK y de su receptor Fn14 está aumentada en el tejido adiposo de obesos severos, pero existen pocos datos acerca de su función y regulación en el contexto de la obesidad.

Es un hecho conocido que en la obesidad existe una inflamación crónica de bajo grado, mediada por la presencia de citocinas proinflamatorias, tanto a nivel sistémico como local. Este estado inflamatorio se ve favorecido por la presencia de hipoxia local y estrés de retículo endoplasmático, hechos que podrían ser responsables de la desregulación de la expresión de TWEAK y Fn14 en el tejido adiposo.

Ante estos antecedentes, postulamos que la citocina TWEAK podría tener un papel en la regulación de la homeostasis del tejido adiposo, y más concretamente, participar en la modulación de la actividad inflamatoria que se observa en obesidad.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA CITOCINA TWEAK Y DE SU RECEPTOR Fn14 EN EL CONTEXTO DE LA OBESIDAD.

Elsa Maymó Masip

Dipòsit Legal: T 322-2016

# OBJETIVOS

## Objetivo general

Evaluar el papel de TWEAK y de su receptor Fn14 en el contexto de la obesidad.

## Objetivos específicos estudio 1

Explorar la expresión del eje TWEAK /Fn14 en tejido adiposo de pacientes con diferentes grados de obesidad y estudiar su regulación a nivel celular (adipocito y macrófago) en el contexto de hipoxia, inflamación, y estrés de RE.

Objetivos intermedios:

- Analizar la expresión génica de *TWEAK* y de *Fn14* en muestras pareadas de TAS y TAV en un grupo de pacientes con diferentes grados de obesidad, con y sin presencia de DMT2 en relación a la expresión de genes de hipoxia, inflamación y estrés de RE.
- Determinar el efecto de la hipoxia, la inflamación y el estrés de RE sobre la expresión de TWEAK y de Fn14 en adipocitos humanos y macrófagos.

## **Objetivos específicos estudio 2**

Determinar si la fracción soluble circulante de TWEAK podría intervenir en el desequilibrio inflamatorio observado en la obesidad severa.

Objetivos intermedios:

- Determinar los niveles de sTWEAK en pacientes con obesidad severa antes y después de cirugía bariátrica.
- Evaluar la expresión de las isoformas de TWEAK (mTWEAK y sTWEAK) y de su receptor en tejido adiposo total y fraccionado de pacientes con obesidad severa.
- Buscar el isotipo de macrófago responsable de la expresión de TWEAK
- Valorar el efecto de sTWEAK sobre la respuesta inflamatoria de TNF $\alpha$  en adipocitos subcutáneos.

# RESULTADOS



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA CITOCINA TWEAK Y DE SU RECEPTOR Fn14 EN EL CONTEXTO DE LA OBESIDAD.

Elsa Maymó Masip

Dipòsit Legal: T 322-2016

## RESULTADOS

### Artículo 1:

*Tumor necrosis-like weak inducer of apoptosis as a proinflammatory cytokine in human adipocyte cells: up-regulation in severe obesity is mediated by inflammation but not hypoxia.*

Vendrell J, Maymó-Masip E, Tinahones F, García-España A, Megia A, Caubet E, García-Fuentes E, Chacón MR.

J Clin Endocrinol Metab. 2010 Jun;95(6):2983-92. doi: 10.1210/jc.2009-2481. Epub 2010 Apr 9.

### Artículo 2:

*The rise of soluble TWEAK levels in severely obese subjects after bariatric surgery may affect adipocyte-cytokine production induced by TNF $\alpha$ .*

Maymó-Masip E, Fernández-Veledo S, García España A, Vázquez-Carballo A, Tinahones FJ, García-Fuentes E, Garrifo-Sanchez L, Rodríguez Mdel M, Vendrell J, Chacón MR.

J Clin Endocrinol Metab. 2013 Aug;98(8):E1323-33. doi: 10.1210/jc.2012-4177. Epub 2013 Jun 19.



## Tumor Necrosis-Like Weak Inducer of Apoptosis as a Proinflammatory Cytokine in Human Adipocyte Cells: Up-Regulation in Severe Obesity Is Mediated by Inflammation But Not Hypoxia

Joan Vendrell,\* Elsa Maymó-Masip,\* Francisco Tinahones, Antonio García-España, Ana Megia, Enric Caubet, Eduardo García-Fuentes, and Matilde R. Chacón

Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas (J.V., E.M.-M., A.M., M.R.C.), Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII. IISPV (Institut d'Investigació Sanitària "Pere Virgili"), Universitat Rovira i Virgili (J.V., E.M.-M., A.M., M.R.C., A.G.-E.), 43007 Tarragona, Spain; Centro de Investigación Biomédica en Red de Fisiopatología, Obesidad y Nutrición (F.T., E.G.-F.), Department of Obesity and Nutrition, Hospital Virgen de la Victoria, Málaga, Spain; Department of Surgery (E.C.), Hospital St. Pau i Sta Tecla, 43003 Tarragona, Spain

**Context:** Adipose tissue hypoxia and endoplasmic reticulum (ER) stress may link the presence of chronic inflammation and macrophage infiltration in severely obese subjects. We previously reported the up-regulation of TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK)/fibroblast growth factor-inducible 14 (Fn14) axis in adipose tissue of severely obese type 2 diabetic subjects.

**Objectives:** The objective of the study was to examine TWEAK and Fn14 adipose tissue expression in obesity, severe obesity, and type 2 diabetes in relation to hypoxia and ER stress.

**Design:** In the obesity study, 19 lean, 28 overweight, and 15 obese nondiabetic subjects were studied. In the severe obesity study, 23 severely obese and 35 control subjects were studied. In the type 2 diabetes study, 11 type 2 diabetic and 36 control subjects were studied. The expression levels of the following genes were analyzed in paired samples of sc and visceral adipose tissue: *Fn14*, *TWEAK*, *VISFATIN*, *HYOU1*, *FIAT*, *HIF-1a*, *VEGF*, *GLUT-1*, *GRP78*, and *XBP-1*. The effect of hypoxia, inflammation, and ER stress on the expression of TWEAK and Fn14 was examined in human adipocyte and macrophage cell lines.

**Results:** Up-regulation of TWEAK/Fn14 and hypoxia and ER stress surrogate gene expression was observed in sc and visceral adipose tissue only in our severely obese cohort. Hypoxia modulates TWEAK or Fn14 expression in neither adipocytes nor macrophages. On the contrary, inflammation up-regulated TWEAK in macrophages and Fn14 expression in adipocytes. Moreover, TWEAK had a proinflammatory effect in adipocytes mediated by the nuclear factor- $\kappa$ B and ERK but not JNK signaling pathways.

**Conclusions:** Our data suggest that TWEAK acts as a pro-inflammatory cytokine in the adipose tissue and that inflammation, but not hypoxia, may be behind its up-regulation in severe obesity. (*J Clin Endocrinol Metab* 95: 2983–2992, 2010)

Obesity as an excess of adipose tissue is attributed to sequential events of hyperplasia and hypertrophy of adipocytes. This disproportionate gain of adipose tissue may be

causal to multilevel obesity-related dysfunctions such as increased risk of coronary heart disease, peripheral arterial disease, stroke, venous thromboembolism, hyper-

ISSN Print 0021-972X ISSN Online 1945-7197

Printed in U.S.A.

Copyright © 2010 by The Endocrine Society

doi: 10.1210/jc.2009-2481 Received November 19, 2009. Accepted March 16, 2010.

First Published Online April 9, 2010

\* J.V. and E.M.-M. contributed equally to this work.

Abbreviations: Ct, Cycle threshold; ER, estrogen receptor; FIAT, fasting-induced adipose factor; Fn14, fibroblast growth factor-inducible 14; GLUT, glucose transporter; GRP78, glucose-regulated protein, 78 kDa; HIF, hypoxia-inducible factor; hr, human recombinant; HYOU1, heat shock protein; JNK, c-Jun N-terminal kinase; LPS, lipopolysaccharide; NF- $\kappa$ B, nuclear factor  $\kappa$ B; SAT, sc adipose tissue; TWEAK, TNF-like weak inducer of apoptosis; VAT, visceral adipose tissue; VEGF, vascular endothelial growth factor; XBP, X-box binding protein.

glycemia, hyperlipidemia, hypertension, and asthma (1). Recently cellular inflammation has emerged as an important mediator of these dysfunctions (2).

Tissue inflammation appears as a response to oxidative stress (3), endoplasmic reticulum (ER) stress (4), and local hypoxia (2). In obesity, hypoxia appears in clusters of adipocytes that become distant from the vasculature as adipose tissue expands (2). These hypoxic patches/clusters of adipocytes enhance ER stress and produce reactive oxygen species, which worsen the inflammatory pathways. These hypoxia-induced processes are highly integrated and work in vicious circles as the tissue tries to overcome the chronic metabolic imbalance. Recently a multifunctional cytokine named TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) that controls many cellular activities has emerged as a new player in the inflammatory processes (5). TWEAK actions are mediated by its binding to fibroblast growth factor-inducible 14 (Fn14), a highly inducible cell surface receptor that has been linked to several intracellular signaling pathways, including the nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) pathway (6). Activation of the proinflammatory transcription factor NF- $\kappa$ B in monocytes and adipocytes is a consistent finding in obese patients (7). The activation of NF- $\kappa$ B can lead to the release of proinflammatory mediators that may also interfere with insulin signaling, causing insulin resistance. It is presently unknown whether TWEAK might play a role in the pathological proinflammatory and hypoxic process associated with obesity. Recently preponderant roles of TWEAK and Fn14 in brain ischemic injuries in human patients have been reported (8). In cerebral ischemia, there is a marked up-regulation of both TWEAK and the receptor Fn14. Interference with TWEAK signaling reduced the infarct size 2 d after the onset of ischemia (9).

We previously reported an increase of TWEAK and Fn14 gene expression in sc adipose tissue (SAT) of severely obese type 2 diabetic patients (10). Likewise, severely obese subjects are characterized by elevated adiposity that can generate hypoxic patches and a high degree of systemic inflammation (11, 12). In this study, to explore further the role of TWEAK and Fn14 in human obesity within the context of hypoxia, inflammation, and ER stress, we examined TWEAK and Fn14 expression levels in cohorts of obese, type 2 diabetes, and severely obese patients in SAT and visceral adipose tissue (VAT) biopsies from the same subject in relation to several hypoxia and ER stress surrogate genes. The effect of hypoxia, inflammation, and ER stress on the expression of TWEAK and Fn14 was also examined in human adipocyte and macrophage cell lines.

**TABLE 1.** Clinical and anthropometrical characteristics of the studied cohorts

	Obesity study cohort			Type 2 diabetes study cohort			Severe obesity study cohort		
	Lean (BMI <25 kg/m <sup>2</sup> ) (n = 19)	Overweight (25 ≤ BMI <30 kg/m <sup>2</sup> ) (n = 28)	Obese (30 ≤ BMI <40 kg/m <sup>2</sup> ) (n = 15)	Control (n = 36)	Type 2 diabetic (n = 11)	P	Control (n = 35)	Severe obesity (n = 23)	P
Age (yr)	51.7 ± 16.0	57.1 ± 15.0	57.4 ± 12.8	61.6 ± 10.6	66.1 ± 8.6	ns	44.5 ± 8.3	40 ± 0.4	ns
Gender (n, male/female)	13/6	16/12	9/6	21/15	5/6	ns	23/12	9/14	ns
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23.6 (24.2)	27.2 (27.9)	32.1 (33.6)	28.6 (31.5)	28.7 (30.4)	<0.001	26.2 ± 3.6	57.4 ± 7.3	<0.001
Waist circumference (cm)	83.0 (90.0)	97.0 (100.0)	107.0 (117.2)	100.0 (107.0)	97.0 (102.0)	<0.001	90.8 ± 13	146.2 ± 23.5	<0.001
FFA (mm)	0.8 (1.2)	0.7 (0.9)	0.8 (1.0)	0.8 ± 0.3	0.9 ± 0.4	ns	0.9 ± 0.5	0.6 ± 0.4	ns
Cholesterol (mm)	5.2 ± 1.2	4.9 ± 1.0	5.2 ± 0.8	5.1 ± 0.9	4.7 ± 1.2	ns	4.8 (5.6)	5.2 (5.5)	ns
HDL-cholesterol (mm)	1.5 ± 0.5	1.3 ± 0.3	1.4 ± 0.3	1.4 (1.6)	1.2 (1.9)	ns	1.3 (1.5)	1 (1.5)	ns
Triglycerides (mm)	1.0 (1.6)	1.1 (1.5)	1.0 (1.3)	1.0 (1.5)	1.7 (2.3)	ns	0.9 (1.5)	1.2 (1.6)	ns
Glucose (mm)	4.8 ± 0.7	5.5 ± 0.5 <sup>a</sup>	5.6 ± 0.5 <sup>b</sup>	5.6 (5.8)	8.3 (10.1)	<0.001	5 (5.7)	5.4 (6.1)	ns
Insulin (μIU/ml)	3.4 (6.7)	4.0 (7.2)	6.6 (16.5)	4.5 (7.7)	10.2 (21.4)	ns	4 (7.6)	23 (51)	<0.001
HOMA-IR	0.75 (1.83)	1.01 (2.09)	1.60 (4.79)	1.22 (2.10)	3.66 (23.66)	0.028	1 (2)	5.4 (13)	<0.001
sIL-6 (pg/ml)	1.4 (2.5)	1.0 (2.2)	2.5 (5.2)	1.4 (2.6)	1.5 (2.4)	0.022	1.3 (2.6)	5.5 (8.9)	<0.001

BMI, Body mass index; FFA, free fatty acid; HDL, high-density lipoprotein; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; sIL-6, soluble IL-6; ns, not significant.

<sup>a</sup> Differences vs. lean.

<sup>b</sup> Differences vs. overweight.



porter (*GLUT-1* (Hs00197884\_m1); glucose-regulated protein, 78 kDa (*GRP78*) Hs99999174\_m1; X-box binding protein (*XBP-1*) (Hs00231936\_m1). Real-time quantitative PCR was performed on the 7900HT fast real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA). The cycle threshold (Ct) value for each sample was normalized with the expression of *PPIA* (Hs99999904\_m1). SDS software 2.3 and RQ Manager 1.2 (Applied Biosystems) were used to analyze the results with the comparative Ct method ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ). All data were expressed as an n-fold difference relative to a calibrator (a mix of different depot samples).

### Cell culture and stimuli

SGBS preadipocyte cells were induced to differentiate to mature adipocytes as described (14). Differentiation was checked by accumulation of intracellular lipids by Oil Red O (Sigma-Aldrich, Barcelona, Spain).

Adipocytes were cultured overnight in serum-free DMEM/F12 (1:1) (Invitrogen, Barcelona, Spain) medium before stimuli.

The human monocytic THP-1 cell line (European Collection of Cell Culture, Wiltshire, UK) was used and cultured as described by Chacón *et al.* (15). Cells were serum deprived overnight before stimulation.

### Inflammatory stimuli

Adipocytes were stimulated for 24 h with 10 and 100 ng/ml with human recombinant (hr) TWEAK (PeproTech, Barcelona, Spain) and 50 ng/ml TNF $\alpha$  (PeproTech). THP-1 cells were treated with 100 ng/ml lipopolysaccharide (LPS; Sigma-Aldrich) for 8 h.

### Hypoxia and ER stress stimuli

Adipocytes were incubated at 37 C in a humidified atmosphere of 95% air-5% CO<sub>2</sub> or placed into a hypoxic chamber (Billups-Rothenberg, Dell Mar, CA) flushed with gas mixture consisting of 1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, and 94% N<sub>2</sub>. Cells were incubated for 24 h at 37 C under these conditions. Chemical hypoxia was induced by treating cells with 200, 100, and 500  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich) for 8 or 24 h.

ER stress was induced by the addition of 1–5  $\mu$ g/ml of tunicamycin (Sigma-Aldrich) for 8 or 24 h.

Dimethylthiazoldiphenyltetra-zoliumbromide-based *in vitro* toxicology assay kit and the lactate dehydrogenase-based assay kit were used as a measure of cell viability (Sigma-Aldrich) in response to hypoxia, TNF $\alpha$ , IL-6, and LPS treatment, as recommended by the manufacturers. Assays were performed in triplicates. We checked that the concentrations used and the length of incubations were noncytotoxic for SGBS and THP-1 cells (data not shown).

### Inhibitor experiments

The signaling pathway was studied by using inhibitors concomitant with 100 ng/ml TWEAK stimulus for 8 h: 10  $\mu$ M parthenolide, 10  $\mu$ M U0126, and 10  $\mu$ M SP0600125 (Merck Chemicals, Barcelona, Spain).

RNA from THP-1 and SGBS mature adipocytes were extracted as described (15). Genes assayed were: *TWEAK*, *Fn14*, *HIF-1 $\alpha$* , and *GRP78* using the probes mentioned above and the following probes for: *MCP-1* (Hs00234140\_m1), *IL-6* (Hs00985641\_m1), *LEP* (leptin; Hs00174877\_m1), *APM1* (adiponectin; Hs00605917\_m1), and *TNF $\alpha$*  (Hs00174128\_m1).

### Western blotting

The Western blotting technique was performed as already described (16). A total of 40  $\mu$ g of protein were subjected to 15% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and probed with anti-TWEAK goat polyclonal antibody (R&D Systems, Vitro S.L., Madrid, Spain) (1:1000) and anti-Fn14 affinity-purified antirabbit (Cell Signaling Technology, Beverly, MA). Rabbit and goat IgG conjugated with peroxidase was used as secondary antibody (1:5000). Placenta and human umbilical endothelial cell protein extracts were used as positive control. All blots were developed with SuperSignal West Femto chemiluminescent substrate (Pierce Biotechnology, Boston, MA) and visualized by VersaDoc imaging system and Quantity One software (Bio-Rad, Barcelona, Spain).

### Statistical analysis

For clinical and anthropometrical variables, normal distributed data are expressed as mean value  $\pm$  SD, and for variables with no Gaussian distribution, values are expressed as median (75th percentile). *In vitro* experimental results are presented as means  $\pm$  SD from three independent experiments performed in duplicates. Statistical significance was tested with the unpaired Student's *t* test or Mann-Whitney *U* test for nonnormally distributed data or one-way ANOVA followed by the protected least-significant difference test or by Kruskal-Wallis *U* for nonnormally distributed data. *P* < 0.05 was considered significant.

## Results

### TWEAK and Fn14 are overexpressed only in adipose tissue in severe obesity

The main anthropometric and analytical characteristics of the obese, type 2 diabetes, and severely obese cohorts in our study are presented in Table 1. When we analyzed *TWEAK* and *Fn14* gene expression in the SAT and VAT adipose tissue depots in the above-mentioned cohorts, only severely obese patients showed that both *TWEAK* and *Fn14* were significantly overexpressed in both SAT and VAT depots when compared with their control group (Table 2). In obese and type 2 diabetic study cohorts, VAT and SAT *TWEAK* and *Fn14* expression lev-

**TABLE 3.** Intragroup study of expression levels of *TWEAK* and *Fn14* in paired SAT and VAT samples

	Lean	Overweight	Obese	Severely obese	Type 2 diabetes
<i>TWEAK</i>	SAT > VAT <i>P</i> = 0.022	SAT > VAT <i>P</i> = 0.003	SAT = VAT <i>P</i> = 0.578	SAT = VAT <i>P</i> = 0.848	SAT > VAT <i>P</i> = 0.006
<i>Fn14</i>	SAT < VAT <i>P</i> = 0.002	SAT < VAT <i>P</i> = 0.024	SAT = VAT <i>P</i> = 0.609	SAT < VAT <i>P</i> = 0.033	SAT = VAT <i>P</i> = 0.477

els did not change among obesity groups or with the presence of type 2 diabetes (Table 2).

Intragroup study of expression levels of *TWEAK* and *Fn14* in paired SAT and VAT samples showed that in obese and severely obese subjects, *TWEAK* expression was similar in both depots (Table 3). In lean, overweight, and type 2 diabetic subjects, *TWEAK* expression was higher in SAT than VAT (Table 3). *Fn14* was predominantly expressed in VAT samples in lean, overweight, and severely obese subjects, whereas in obese and type 2 diabetic subjects, the expression was similar (Table 3).

### Hypoxia and ER gene expression markers are highly expressed in SAT and VAT tissue of the severely obese subjects

Hypoxia could be behind the overexpression of *TWEAK* and *Fn14* in severe obese adipose tissue, and hence, we analyzed the relative expression levels in SAT and VAT depots from our obese and severely obese cohorts of widely accepted surrogate genes for hypoxia (2) and ER stress (4) listed in Table 4. Genes selected were: *HIF-1 $\alpha$* , a key transcription factor in hypoxia; *VEGF*, an angiogenic marker hypoxia regulated; *VISFATIN*, a proinflammatory and potentially insulin-mimetic adipokine regulated by *HIF-1 $\alpha$* ; *FIAP* (fasting-induced adipose factor), involved in lipid metabolism and up-regulated by *HIF-1 $\alpha$* ; *GLUT-1*, a glucose transporter gene found to be increased under hypoxia; and *HYOU1*, an oxygen-regulated gene. The markers of ER stress transducers selected were: *XBP-1*; X-box, a transcription factor that modulates the ER stress response; and *GRP78*, a glucose-regulated gene strongly related with hypoxia (see Supplemental Table 1, published as supplemental data on The Endocrine Society's Journals Online web site at <http://jcem.endojournals.org>).

We observed that in the severely obese subjects, all selected genes were significantly up-regulated when compared with the control group (Table 4). Almost all analyzed genes (excepted *FIAP*, *HYOU1*, and *GRP78*) were expressed in significantly higher amounts in VAT than SAT depots.

In contrast, in the obesity study cohort, only *VEGF* was found to be up-regulated in lean subjects without differences for the rest of hypoxia and ER stress-explored genes (Table 4).

No significant differences in gene expression levels were found with the presence of type 2 diabetes for the selected hypoxia or endoplasmic reticulum gene markers (data not shown).

### Inflammatory but not hypoxic or ER stress stimuli modulate *Fn14* expression in human adipocytes

In view of the above-mentioned results, we questioned whether inflammation, hypoxia, or hypoxia-induced ER stress could be behind the up-regulation of *TWEAK* and

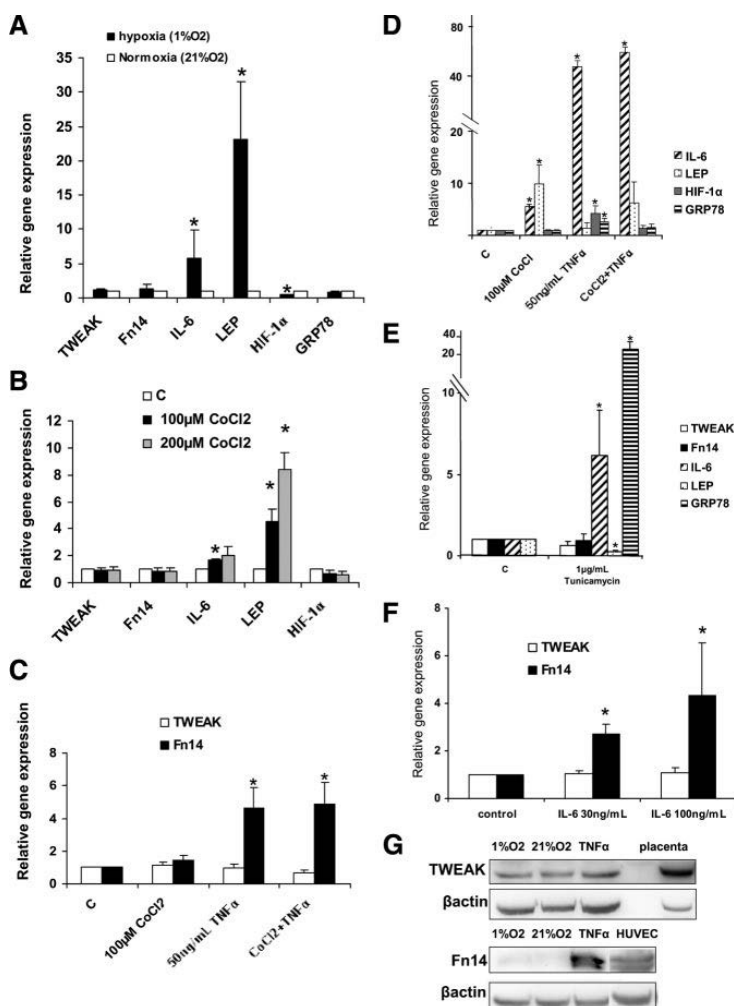
**TABLE 4.** Gene expression analysis of surrogate hypoxia and ER stress genes in SAT and VAT samples in obesity (arbitrary units)

Depot	Obesity study cohort						Severe obesity study cohort					
	Lean (n = 19)		Overweight (n = 28)		Obese (n = 15)		Control group (n = 35)		Severe obese (n = 23)			
	SAT	VAT	SAT	VAT	SAT	VAT	SAT	VAT	SAT	VAT	SAT	VAT
Hypoxia												
<i>VISFATIN</i>	1.2 (2.7)	0.8 (1.3)	0.9 (1.4)	0.8 (1.1)	1 (1.9)	0.8 (1.1)	1.2 (2.5)	0.9 (1.3)	1.6 (7.2) <sup>a</sup>	6.6 (27.8) <sup>a,b</sup>		
<i>FIAP</i>	2 ± 0.9 <sup>b</sup>	1.1 ± 0.6	1.8 ± 0.6 <sup>b</sup>	0.9 ± 0.6	1.5 ± 0.5	1.3 ± 0.9	1.7 ± 0.72 <sup>b</sup>	1.14 ± 0.7	2.8 ± 1.54 <sup>a,b</sup>	1.8 ± 1.34 <sup>a</sup>		
<i>HIF-1<math>\alpha</math></i>	0.9 (19)	1 (1.2)	0.9 (1)	0.9 (1)	1 (1.3)	1 (1.3)	0.9 (1.1)	1 (1.3) <sup>b</sup>	1.8 (4.5) <sup>a</sup>	3.2 (5.3) <sup>a,b</sup>		
<i>HYOU1</i>	0.8 ± 0.2	1 ± 0.2 <sup>b</sup>	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.2	0.9 ± 0.2	0.9 ± 0.1	0.8 (1)	0.9 (1)	1.4 (1.6) <sup>a</sup>	1.4 (1.7) <sup>a</sup>		
<i>GLUT1</i>	1 (1.8)	1.6 (2.3) <sup>b</sup>	0.9 (1.2)	1.1 (1.6) <sup>b</sup>	0.9 (1.2)	1.3 (1.7)	1 (1.1)	1.1 (1.7) <sup>b</sup>	2.7 (4.8) <sup>a</sup>	5.1 (9.4) <sup>a,b</sup>		
<i>VEGF</i>	1.4 (2) <sup>a</sup>	1.5 (1.7) <sup>a</sup>	1 (1.3)	1 (1.5)	1 (1.5)	1 (1.2)	1.3 (1.8)	1.2 (1.5)	2.5 (4.3) <sup>a</sup>	6.5 (9) <sup>a,b</sup>		
ER stress												
<i>GRP78</i>	0.9 ± 0.2	1.1 ± 0.2 <sup>b</sup>	0.8 ± 0.1	1 ± 0.3 <sup>b</sup>	0.9 ± 0.3	1 ± 0.2	0.9 ± 0.2	1 ± 0.2 <sup>b</sup>	1.4 ± 0.6 <sup>a</sup>	1.8 ± 1 <sup>a</sup>		
<i>XBP-1</i>	0.8 ± 0.2	1 ± 0.3 <sup>b</sup>	0.8 ± 0.1	1 ± 0.2 <sup>b</sup>	0.8 ± 0.2	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.2	1 ± 0.3 <sup>b</sup>	0.9 ± 0.5 <sup>a</sup>	1.6 ± 0.9 <sup>a,b</sup>		

<sup>a</sup> Differences when comparing same depot between obesity group study ( $P < 0.05$ ).

<sup>b</sup> Differences when comparing depots within same obesity group ( $P < 0.05$ ).





**FIG. 1.** Effect of hypoxia, inflammation, and ER stress on *TWEAK* and *Fn14* gene expression in SGBS adipocytes. A, Differentiated adipocytes (d 14) were exposed 24 h to hypoxia (1% O<sub>2</sub>) or normoxia (21% O<sub>2</sub>). Relative gene expression levels of *TWEAK*, *Fn14*, *IL-6*, *LEP*, *HIF-1α*, and *GRP78* were measured. B, Effect of chemical hypoxia induced by CoCl<sub>2</sub> on the mRNA levels of *TWEAK*, *Fn14*, *IL-6*, *LEP*, and *HIF-1α*. C and D, Effect of a 24-h TNFα inflammatory stimulus and both TNFα plus CoCl<sub>2</sub> on gene expression of *TWEAK*, *Fn14*, *IL-6*, *LEP*, *HIF-1α*, and *GRP78*. E, Analysis of *TWEAK*, *Fn14*, *IL-6*, *LEP*, *HIF-1α*, and *GRP78* gene expression in response to ER stress stimuli induced by 24 h treatment with tunicamycin. F, Effect of IL-6 stimulus on *TWEAK* and *Fn14* expression. Results are means ± SD of three independent experiments. \*, *P* < 0.05, compared with untreated controls. G, Western blot analysis of Tweak and Fn14 protein expression in extracts of SGBS mature adipocyte after exposure to 24 h of a hypoxic (1% O<sub>2</sub>) or to a TNFα inflammatory stimulus. One gel, representative of two independent experiments performed in duplicate, is shown for each panel. Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) extract and placenta extract were used as positive controls.

*Fn14* mRNA in the severely obese subjects. To this end we analyzed *TWEAK* and *Fn14* expression in SGBS mature adipocytes under hypoxic conditions induced either chemically (CoCl<sub>2</sub>) or by low oxygen tension (1% O<sub>2</sub>).

In these conditions, whereas *TWEAK* and *Fn14* gene expression was not affected (Fig. 1, A and C), *IL-6* and

*LEP* mRNA were up-regulated (Fig. 1, A, B, and D). *TNFα* gene expression was below detection levels (data not shown).

We found that *HIF-1α* gene expression was down-regulated by the hypoxic stimulus and *GRP78* expression was not altered (Fig. 1A).

To analyze the effect of an ER stress stimulus on *TWEAK* and *Fn14* expression in adipocytes, we used 1 μg/ml of tunicamycin for 24 h. We observed that tunicamycin had no effect on *TWEAK* or *Fn14* expression. However, *IL-6*, *LEP*, and *GRP78* expression were altered under these conditions (Fig. 1E).

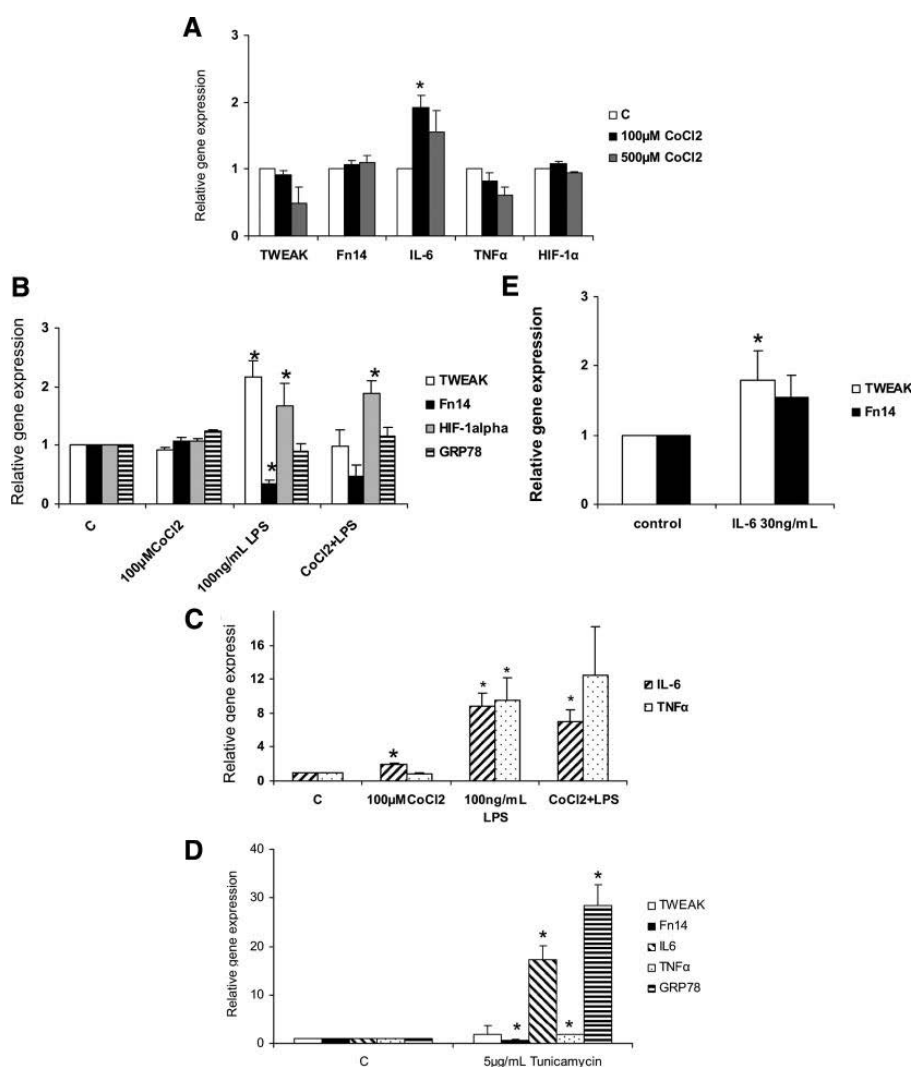
In contrast, when we tested an inflammatory stimulus (50 ng/ml TNFα for 24 h), we found *Fn14* expression significantly increased at mRNA (Fig. 1C) and protein levels (Fig. 1G).

Both stimuli together, hypoxia and inflammation, did not affect *TWEAK* gene expression and did not increase the inflammatory effect of TNFα over *Fn14* gene expression (Fig. 1C). TNFα significantly increased *HIF-1α* and *GRP78* (Fig. 1D).

Also, as an inflammatory stimulus, we tested IL-6 for 24 h, which produced a significant increase in *Fn14* gene expression, whereas *TWEAK* gene expression was not altered (Fig. 1F).

### Inflammatory stimuli but not hypoxia or ER stress stimuli modulate *TWEAK* expression in macrophages

Macrophages are an important component of adipose tissue milieu in severe obesity and have been shown to contribute to the inflammatory state observed in obesity. To analyze the effect on *TWEAK* and *Fn14* of a hypoxic or an inflammatory stimulus over human macrophages, we tested THP-1 human macrophage cell line under a chemical hypoxic stimulus. We found that hypoxia, induced chemically with 100 μM CoCl<sub>2</sub>, did not change the expression levels of *TWEAK* and *Fn14* (Fig. 2, A and B). We decided to use a dose of 100 ng/ml LPS as an inflammatory stimulus on phorbol-12-myristate-13-acetate-pretreated THP-1 cells instead of TNFα because doses of



**FIG. 2.** Effect of hypoxia, inflammation, and ER stress on *TWEAK* and *Fn14* gene expression in THP-1 macrophages. A, Effect of 8 h chemical hypoxia on the mRNA expression levels of *TWEAK*, *Fn14*, *IL-6*, *TNF $\alpha$* , and *HIF-1 $\alpha$* . B and C, Effect of an LPS inflammatory stimulus and both LPS plus hypoxia on gene expression of *TWEAK*, *Fn14*, *HIF-1 $\alpha$* , and *GRP78* (B), and *IL-6* and *TNF $\alpha$*  (C). D, Analysis of *TWEAK*, *Fn14*, *IL-6*, *TNF $\alpha$* , and *GRP78* gene expression changes in response to an ER stress stimulus induced by 8 h treatment with tunicamycin. E, Effect of *IL-6* stimuli on *TWEAK* and *Fn14* gene expression levels.

*TNF $\alpha$*  ranging from 0.1 to 50 ng/ml for 8 h produced no significant effect on cytokine stimulation (data not shown). Both LPS and *TNF $\alpha$*  are known to activate in THP-1 overlapping signaling pathways (17, 18), although with different intensities. We observed that an inflammatory stimulus induced by LPS significantly up-regulated *TWEAK* and *HIF-1 $\alpha$*  gene expression and down-regulated *Fn14* (Fig. 2B).

*IL-6* and *TNF $\alpha$*  mRNA were found both significantly up-regulated under inflammation induced by LPS, but chemical hypoxia up-regulated only *IL-6* (Fig. 2C).

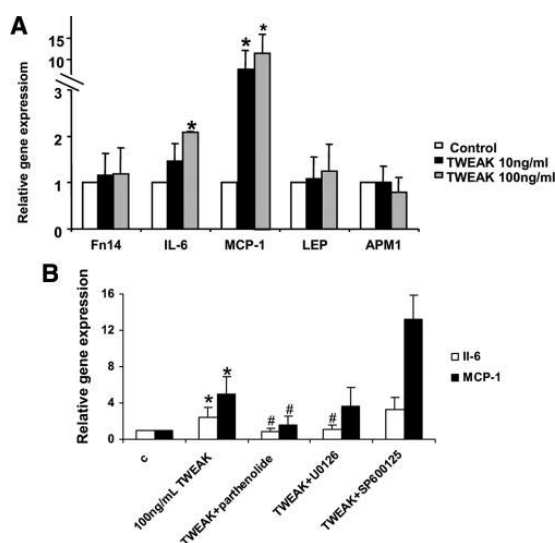
An ER stress stimulus induced by 5  $\mu$ g/ml tunicamycin for 8 h significantly increased *IL-6*, *TNF $\alpha$* , and *GRP78* but did

not alter *TWEAK* gene expression. *Fn14* mRNA was found significantly down-regulated by tunicamycin (Fig. 2D).

*IL-6* stimuli over THP-1 macrophage significantly up-regulated only *TWEAK* gene expression levels (Fig. 2E).

### TWEAK acts as proinflammatory cytokine over human adipocyte cells

To explore the role of *TWEAK* over adipocytes, we stimulated SGBS adipocytes with 10 or 100 ng/ml hr*TWEAK* for 24 h. *TWEAK* stimulation led to a significant increase in mRNA levels of *IL-6* and *MCP-1* (Fig. 3A). *Fn14*, *APM1*, and *LEP* gene expression were un-



**FIG. 3.** Proinflammatory effect of Tweak in SGBS adipocyte signaling pathways. A, Cytokine and adipokine responses to Tweak stimulation over human SGBS mature adipocytes. SGBS cells at d 14 of differentiation to adipocytes were stimulated for 24 h with 10 or 100 ng/ml hrTweak. Gene expression of TWEAK receptor *Fn14*, cytokines (*IL-6* and *MCP-1*), and adipokines (*APM1* and *LEP*) were measured by quantitative RT-PCR. B, Signaling pathway implicated in the proinflammatory effects of TWEAK. Mature adipocytes were incubated for 8 h with 100 ng/ml TWEAK and simultaneously with 10  $\mu$ M parthenolide (NF- $\kappa$ B inhibitor); 10  $\mu$ M U0126 (inhibitor of ERK1/2); and 10  $\mu$ M SP600125 (inhibitor of JNK1). Shown here are the mean  $\pm$  SD values of three independent experiments. \*,  $P < 0.05$ , compared with untreated controls; #,  $P < 0.05$  compared with 100 ng/ml TWEAK.

changed under these conditions. *TNF $\alpha$*  mRNA levels were undetectable (Fig. 3A).

To determine which signaling pathway was switched on, we used parthenolide as NF- $\kappa$ B inhibitor, U0126 as MAPK kinase-ERK1/2 inhibitor, and SP600125 as c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor. We observed that inhibition of NF- $\kappa$ B and MAPK kinase-ERK1/2 reduced the gene expression of *IL-6* and *MCP-1*, whereas JNK inhibition did not reduce the expression of *IL-6* and increased *MCP-1* expression (Fig. 3B).

## Discussion

Within adipose tissue, a common feature of the inflammatory process associated with obesity is the altered expression of many cytokines and adipokines. We recently reported that the TWEAK/*Fn14* axis may be a new component of the network that participates in the inflammatory imbalance observed in obesity and insulin resistance states (10). In this sense, Tweak and *Fn14* expression have been detected in carotid atherosclerotic plaques, suggesting a pathological role of TWEAK/*Fn14* axis in this obesity-related comorbidity (19).

In the present study, we showed that TWEAK/*Fn14* up-regulation in SAT and VAT tissue was linked to severe obesity. One particularity of severe obesity is the presence of elevated systemic inflammation (11, 12). At tissue level, the precise mechanisms behind this inflammatory response as the adipose tissue mass expands are not well known. It has been suggested that hypoxia could be a key trigger of adipose tissue dysfunction because hypoxia generates tissue inflammation (2). In obese human subjects, decreased oxygen partial pressure within the adipose tissue was paralleled by an increase in the expression and secretion of the chemokine and markers of macrophage infiltration (20).

Interestingly, we found up-regulation of hypoxia response genes such as *VEGF*, *GLUT1*, *FIAP*, *VISFATIN*, and *HIF-1 $\alpha$*  only in our cohort of severely obese patients. The up-regulation of *HIF-1 $\alpha$*  observed in adipose tissue of our severely obese subjects is in accordance with previous reports (21). However, in view of our own and others' *in vitro* studies that showed *HIF-1 $\alpha$*  mRNA down-regulation in adipocytes (2), the high expression found in whole adipose tissue may be accounted for mainly by the cells in the stromovascular fraction, as has been previously suggested (22). No changes in hypoxia and ER stress genes were observed in our obese cohort; only *VEGF* was found overexpressed in the lean subjects, which is in accordance with a recent scientific report (20).

On the other hand, the proinflammatory milieu facilitated by hypoxia in adipose tissue may represent an important stimulus for macrophage attraction. It is known that adipose tissue in severe obesity is highly infiltrated (up to 40%) with macrophages; this in turn generates a vicious circle producing a high degree of tissue inflammation (22).

In view of the parallel up-regulation of TWEAK/*Fn14* (this study and Ref. 10) and hypoxia-specific genes in severe obesity, we considered that hypoxia could be modulating TWEAK/*Fn14* gene expression in adipose tissue of these patients. Our experimental data showed that hypoxia did not regulate *per se* TWEAK and *Fn14* expression in SGBS adipocytes cells or THP-1 macrophage. Similarly to hypoxia, TWEAK and *Fn14* expression in both adipocytes and macrophage cells was not changed by an ER stress stimulus, whereas changes in the production of inflammation-related cytokines in SGBS adipocyte cells were consistent with the original hypoxia hypothesis; *IL-6* and *LEP* were found up-regulated and *TNF $\alpha$*  was not altered under hypoxic conditions (23, 24).

Inflammatory stimuli *in vitro* differentially increased the expression of TWEAK in macrophages and *Fn14* in adipocytes. But both hypoxia and inflammatory stimulus strongly increased expression, in both adipocytes and macrophages, of *IL-6*, a potent inflammatory cytokine.

On the other hand, IL-6 circulating levels were highly increased in our severely obese subjects. Moreover, hypoxia has been described as a positive stimulus for IL-6 (25). Interestingly, when we stimulated adipocyte and macrophage cells with IL-6, we observed the same effects as depicted by the inflammatory stimuli of TNF $\alpha$  in adipocytes and LPS in macrophages: a specific up-regulation of TWEAK in macrophages and *Fn14* in adipocytes. These findings suggest a possible paracrine action of TWEAK expressed by macrophages over Fn14 up-regulated receptor in adipocytes.

In adipose tissue fractions of severely obese subjects, expression of *Fn14* was higher in the stromovascular fraction than in the mature isolated adipocyte (10). However, the precise contribution of adipocytes, macrophages and other cells to the production of TWEAK and Fn14 is difficult to assess quantitatively. It is not certain whether the process of preparation and subsequent incubation of the different cell fractions alters their relative rate of production and release of various adipokines. In addition, large adipocytes show the highest rates of production of inflammatory adipokines (26), but because of their greater fragility, they are likely to be underrepresented, or absent, from most cell fractionations.

What, in turn, could be the biological effect of TWEAK over adipocytes? Our experiments suggest an active participation of TWEAK in the inflammatory environment found in obesity because we show for the first time that TWEAK has a proinflammatory effect over human adipocyte cells in which it induces the expression of the proinflammatory cytokines IL-6 and MCP-1. What could the molecular mechanisms be by which adipocytes sense and respond to TWEAK? In other cell types, the binding of TWEAK to its receptor, Fn14, has been shown to activate a limited set of signaling pathways involved in cell proliferation and differentiation, including NF- $\kappa$ B activation, which is associated with its proinflammatory effect (6): MAPK, JNK, ERK (27), and p38 MAPK (28, 29). Here we showed that activation of NF- $\kappa$ B and ERK1/2 signaling pathways was implicated in the proinflammatory process of TWEAK over human adipocytes. In THP-1 macrophage cells, TWEAK signal transduction has been shown to be NF- $\kappa$ B dependent and induced the degradation of inhibitory- $\kappa$ B (30).

In conclusion, in the present paper, we show, for the first time, that TWEAK acts as a proinflammatory cytokine in human adipocyte cells. We report an overexpression of TWEAK/*Fn14* and hypoxia characteristic genes in both SAT and VAT adipose tissue depots of severely obese patients; however, both TWEAK and *Fn14* genes were not hypoxia sensitive. The increment of TWEAK and Fn14 in severe obesity may be due to the inflammatory environ-

ment, in particular that caused by the presence of IL-6, a cytokine that could be playing a key role in TWEAK/Fn14 regulation.

## Acknowledgments

We thank Dr. Anna Sola (Department of Ischemia and Inflammation, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona- Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Institut d'investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IIBB-CSIC-IDIBAPS) for letting us perform the hypoxia chamber studies in her laboratory and Dr. Martin Wabitsch (University of Ulm, Ulm, Germany) for kindly providing us with the SGBS cell line.

Address all correspondence and requests for reprints to: Dr. Matilde R. Chacón., Research Unit, University Hospital of Tarragona Joan XXIII, c/o Dr. Mallafré Guasch, 4, 43007 Tarragona, Spain. E-mail: mrodriguez.hj23.ics@gencat.cat.

This work was supported by Grants from Fondo de Investigación Sanitaria PI 08/0733 and CP06/00119 cofinanced by the European Regional Development Fund. Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CB07/08/0012) is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII). A.G.-E. is supported by the Research Stabilization Program of the ISCIII-Institut Català de Salut in Catalonia. M.R.C. is supported by a fellowship from the Fondo de Investigación Sanitaria (CP06/00119).

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

## References

- Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP 2008 Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:367-377
- Trayhurn P, Wang B, Wood IS 2008 Hypoxia in adipose tissue: a basis for the dysregulation of tissue function in obesity? *Br J Nutr* 100:227-235
- Houstis N, Rosen ED, Lander ES 2006 Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* 440:944-948
- Gregor MF, Hotamisligil GS 2007 Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. *J Lipid Res* 48:1905-1914
- Burkly LC, Michaelson JS, Hahm K, Jakubowski A, Zheng TS 2007 TWEAKing tissue remodeling by a multifunctional cytokine: role of TWEAK/Fn14 pathway in health and disease. *Cytokine* 40:1-16
- Winkles JA 2008 The TWEAK-Fn14 cytokine-receptor axis: discovery, biology and therapeutic targeting. *Nat Rev Drug Discov* 7:411-425
- Dandona P, Aljada A, Chaudhuri A, Mohanty P, Garg R 2005 Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. *Circulation* 111:1448-1454
- Yepes M 2007 Tweak and FN14 in central nervous system health and disease. *Front Biosci* 12:2772-2781
- Potrovita I, Zhang W, Burkly L, Hahm K, Lincecum J, Wang MZ, Maurer MH, Rossner M, Schneider A, Schwanninger M 2004 Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis-induced neurodegeneration. *J Neurosci* 24:8237-8244
- Chacón MR, Richart C, Gómez JM, Megía A, Villarrasa N, Fernández-

- Real JM, García-España A, Miranda M, Masdevall C, Ricard W, Caubet E, Soler J, Vendrell J 2006 Expression of TWEAK and its receptor Fn14 in human subcutaneous adipose tissue. Relationship with other inflammatory cytokines in obesity. *Cytokine* 33:129–137
11. Chacón MR, Miranda M, Jensen CH, Fernández-Real JM, Vilarrasa N, Gutiérrez C, Näf S, Gomez JM, Vendrell J 2008 Human serum levels of fetal antigen 1 (FAI/Dlk1) increase with obesity, are negatively associated with insulin sensitivity and modulate inflammation *in vitro*. *Int J Obes* 32:1122–1129
  12. Simón I, Escoté X, Vilarrasa N, Gómez J, Fernández-Real JM, Megía A, Gutiérrez C, Gallart L, Masdevall C, Vendrell J 2009 Adipocyte fatty acid-binding protein as a determinant of insulin sensitivity in morbid-obese women. *Obesity* 17:1124–1128
  13. Ceperuelo-Mallafre V, Näf S, Escoté X, Caubet E, Gomez JM, Miranda M, Chacon MR, Gonzalez-Clemente JM, Gallart L, Gutiérrez C, Vendrell J 2009 Circulating and adipose tissue gene expression of zinc- $\alpha$ 2-glycoprotein in obesity: its relationship with adipokine and lipolytic gene markers in subcutaneous and visceral fat. *J Clin Endocrinol Metab* 94:5062–5069
  14. Wabitsch M, Brenner RE, Melzner I, Braun M, Möller P, Heinze E, Debatin KM, Hauner H 2001 Characterization of a human preadipocyte cell strain with high capacity for adipose differentiation. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25:8–15
  15. Chacón MR, Ceperuelo-Mallafre V, Maymó-Masip E, Mateo-Sanz JM, Arola L, Gutiérrez C, Fernandez-Real JM, Ardèvol A, Simón I, Vendrell J 2009 Grape-seed procyanidins modulate inflammation on human differentiated adipocytes *in vitro*. *Cytokine* 47:137–142
  16. García-España A, Salazar E, Sun TT, Wu XR, Pellicer A 2005 Differential expression of cell cycle regulators in phenotypic variants of transgenically induced bladder tumors: implications for tumor behavior. *Cancer Res* 65:1150–1157
  17. Utsugi M, Dobashi K, Ishizuka T, Endou K, Hamuro J, Murata Y, Nakazawa T, Mori M 2003 c-Jun N-terminal kinase negatively regulates lipopolysaccharide-induced IL-12 production in human macrophages: role of mitogen-activated protein kinase in glutathione redox regulation of IL-12 production. *J Immunol* 171:628–635
  18. Qi XF, Kim DH, Yoon YS, Jin D, Huang XZ, Li JH, Deung YK, Lee KJ 2009 Essential involvement of cross-talk between IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  in CXCL10 production in human THP-1 monocytes. *J Cell Physiol* 220:690–697
  19. Muñoz-García B, Martín-Ventura JL, Martínez E, Sánchez S, Hernández G, Ortega L, Ortiz A, Egido J, Blanco-Colio LM 2006 Fn14 is up-regulated in cytokine-stimulated vascular smooth muscle cells and is expressed in human carotid atherosclerotic plaques: modulation by atorvastatin. *Stroke* 37:2044–2053
  20. Pasarica M, Sereda OR, Redman LM, Albarado DC, Hymel DT, Roan LE, Rood JC, Burk DH, Smith SR 2009 Reduced adipose tissue oxygenation in human obesity: evidence for rarefaction, macrophage chemotaxis, and inflammation without an angiogenic response. *Diabetes* 58:718–725
  21. Maumus M, Sengenès C, Decaunes P, Zakaroff-Girard A, Bourlier V, Lafontan M, Galitzky J, Bouloumié A 2008 Evidence of *in situ* proliferation of adult adipose tissue-derived progenitor cells: influence of fat mass microenvironment and growth. *J Clin Endocrinol Metab* 93:4098–4106
  22. Canello R, Henegar C, Viguerie N, Taleb S, Poitou C, Rouault 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 2005 Reduction of macrophage infiltration and chemo-attractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes* 54:2277–2286
  23. Trayhurn P, Wood IS 2004 Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 92:347–355
  24. Wang B, Wood IS, Trayhurn P 2007 Dysregulation of the expression and secretion of inflammation-related adipokines by hypoxia in human adipocytes. *Pflugers Arch* 455:479–492
  25. Eder K, Baffy N, Falus A, Fulop AK 2009 The major inflammatory mediator interleukin-6 and obesity. *Inflamm Res* 58:727–736
  26. Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, Hauner H 2007 Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 92:1023–1033
  27. Vincent C, Findlay DM, Welldon KJ, Wijenayaka AR, Zheng TS, Haynes DR, Fazzalari NL, Evdokiou A, Atkins GJ 2009 Pro-inflammatory cytokines TNF-related weak inducer of apoptosis (TWEAK) and TNF $\alpha$  induce the mitogen-activated protein kinase (MAPK)-dependent expression of sclerostin in human osteoblasts. *J Bone Miner Res* 24:1434–1449
  28. Saas P, Boucraut J, Walker PR, Quiquerez AL, Billot M, Desplat-Jego S, Chicheportiche Y, Dietrich PY 2000 TWEAK stimulation of astrocytes and the pro-inflammatory consequences. *Glia* 32:102–107
  29. Li H, Mittal A, Paul PK, Kumar M, Srivastava DS, Tyagi SC, Kumar A, Mandard S, Zandbergen F, van Straten E, Wahli W, Kuipers F, Müller M, Kersten S 2006 The fasting-induced adipose factor/angiopoietin-like protein 4 is physically associated with lipoproteins and governs plasma lipid levels and adiposity. *J Biol Chem* 281:934–944
  30. Kim SH, Kang YJ, Kim WJ, Woo DK, Lee Y, Kim DI, Park YB, Kwon BS, Park JE, Lee WH 2004 TWEAK can induce pro-inflammatory cytokines and matrix metalloproteinase-9 in macrophages. *Circ J* 68:396–399

### Supplemental Table 1

Gene	Function	Reference
<i>VISFATIN</i>	Pro-inflammatory and potentially insulin-mimetic adipokine. hypoxia regulated gene.	Segawa et al. 2006
<i>FIAF</i>	Lipid metabolism. Highly up-regulated during hypoxia	Kersten, 2005
<i>HIF-1<math>\alpha</math></i>	Key transcription factor in hypoxia	Frede et al., 2007
<i>HYOU1</i>	Oxygen-regulated protein (150 kDa) has been reported to be linked to type 2 diabetes and obesity.	Kovacs et al., 2002
<i>GLUT1</i>	Glucose transporter 1 gene in human adipocytes. It has been found to be increased under hypoxia.	Wood et al., 2007
<i>VEGF</i>	Mediator of inflammation and an angiogenic factor and it is hypoxia regulated.	Jiang et al., 2006
<i>GRP78</i>	Protein strongly related with glucose metabolism and ER stress.	Hosogai et al., 2007
<i>XBP-1</i>	Transcription factor that modulates the ER stress response.	Ozcan et al., 2004

Frede S et al. Regulation of hypoxia-inducible factors during inflammation. *Methods Enzymol.* 2007;435:405-19. Review.

Hosogai N et al. 2007. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes.* 56:901-11.

Jiang M et al. 2006. Inhibition of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and endothelial progenitor cell differentiation by adenoviral transfer of small interfering RNA in vitro. *J Vasc Res.* 43:511-21.

Kersten S. 2005. Regulation of lipid metabolism via angiotensin-like proteins. *Biochem Soc Trans.* Nov;33(Pt 5):1059-62. Review

Kovacs P et al (2002). Polymorphisms in the Oxygen-Regulated Protein 150 Gene (ORP150) Are Associated With Insulin Resistance in Pima Indians. *Diabetes* 51:1618-1621

Ozcan U et al. 2004. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 306::457-61.

Segawa et al. 2006. Visfatin in adipocytes is up-regulated by hypoxia through HIF1 $\alpha$ -dependent mechanism. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 349: 875-882.

Wood IS et al. 2007. Hypoxia increases expression of selective facilitative glucose transporters (GLUT) and 2-deoxy-D-glucose uptake in human adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 361:468-73.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA CITOCINA TWEAK Y DE SU RECEPTOR Fn14 EN EL CONTEXTO DE LA OBESIDAD.

Elsa Maymó Masip

Dipòsit Legal: T 322-2016

## The Rise of Soluble TWEAK Levels in Severely Obese Subjects After Bariatric Surgery May Affect Adipocyte-Cytokine Production Induced by TNF $\alpha$

Elsa Maymó-Masip, Sonia Fernández-Veledo, Antonio García España, Ana Vázquez-Carballo, Francisco José Tinahones, Eduardo García-Fuentes, Lourdes Garrifo-Sanchez, Maria del Mar Rodriguez, Joan Vendrell,\* and Matilde R. Chacón

Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas (E.M.-M., S.F.-V., A.V.-C., L.G.-S., J.V., M.R.C.); Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII (E.M.-M., S.F.-V., A.G.-E., L.G.-S., J.V., M.R.C.); Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili, 28027 Madrid, Spain; Department of Biochemistry and Molecular Biology II (A.V.-C.), Faculty of Pharmacy, Complutense University, 28040 Madrid, Spain; Centro de Investigación Biomédica en Red de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición Fisiopatología, Obesidad y Nutrición (F.J.T., E.G.-F., M.M.R.); Department of Obesity and Nutrition (F.J.T.), Hospital Virgen de la Victoria, 29010 Málaga, Spain; Servicio de Endocrinología y Nutrición (E.G.-F.), Hospital Regional Universitario Carlos Haya, 29004 Málaga, Spain; Instituto de Investigaciones Biomédicas de Málaga (E.G.-F.), 29009 Málaga, Spain; and Department of Diabetes, Endocrinology, and Nutrition (M.M.R.), Institut d'Investigació Biomèdica de Girona, 17007 Girona, Spain

**Context:** Soluble TNF-like weak inducer of apoptosis (sTWEAK) is generated by the intracellular proteolytic cleavage of full-length membrane-bound TNF-like weak inducer of apoptosis (mTWEAK). sTWEAK levels are reduced in diseases with an inflammatory component. Additionally, sTWEAK hampers TNF $\alpha$  activity in human cells.

**Objectives:** The objectives of the study were as follows: 1) to determine circulating sTWEAK in severe obesity and after bariatric surgery; 2) to study m/sTWEAK and its receptor fibroblast growth factor-inducible 14 (Fn14) protein expression in sc adipose tissue (SAT) of severely obese subjects, in SAT stromal vascular fraction (SVF), and isolated adipocytes and in human monocyte-derived macrophages; and 3) to explore, on human adipocytes, the sTWEAK effect on TNF $\alpha$  proinflammatory activity.

**Design:** sTWEAK levels were measured in cohort 1: severely obese subjects (n = 23) and a control group (n = 35); and in cohort 2: (n = 23) severely obese subjects before and after surgery. The m/sTWEAK and Fn14 expressions were determined in SAT biopsies, SVF, and isolated adipocytes from severely obese and control subjects and in human monocyte-derived macrophages. In human primary cultured adipocytes, sTWEAK pretreated and TNF $\alpha$  challenged, IL-6, IL-8, and adiponectin protein and gene expressions were determined and nuclear factor- $\kappa$ B and MAPK signaling analyzed.

**Results:** sTWEAK levels were reduced in severely obese subjects. After surgery, sTWEAK levels rose in 69% of patients. mTWEAK protein expression was increased in SAT and SVF of severely obese subjects, whereas Fn14 was up-regulated in isolated adipocytes. M2 human monocyte-derived macrophages overexpress mTWEAK. In human adipocytes, sTWEAK down-regulates TNF $\alpha$  cytokine production by hampering TNF $\alpha$  intracellular signaling events.

**Conclusion:** The decrease of sTWEAK in severely obese patients may favor the proinflammatory activity elicited by TNF $\alpha$ . (*J Clin Endocrinol Metab* 98: E1323–E1333, 2013)

ISSN Print 0021-972X ISSN Online 1945-7197

Printed in U.S.A.

Copyright © 2013 by The Endocrine Society

Received December 11, 2012. Accepted May 21, 2013.

First Published Online June 19, 2013

\* J.V. and M.R.C. contributed equally to this work.

Abbreviations: BMI, body mass index; CI, confidence interval; CRP, C-reactive protein; FFA, free fatty acid; Fn14, fibroblast growth factor-inducible 14; HDL, high-density lipoprotein; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; I $\kappa$ B, inhibitory- $\kappa$ B; JNK, c-Jun N-terminal kinase; mTWEAK, full-length TWEAK isoform; NF- $\kappa$ B, nuclear factor  $\kappa$ -light-chain enhancer of activated B cells; P, phosphorylated; P38, mitogen-activated protein kinases; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; SAPK, stress-activated protein kinase; SAT, sc adipose tissue; sTWEAK, soluble TWEAK isoform; SVF, stromal vascular fraction; TWEAK, TNF weak inducer of apoptosis.



**T**NF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK), a member of the TNF superfamily of cytokines, is a multifunctional cytokine that controls many cellular activities including proliferation, migration, differentiation, apoptosis, angiogenesis, and inflammation (1). High levels of TWEAK mRNA have been found in many tissues such as lymph nodes, pancreas, intestine, heart, brain, lung, ovary, vasculature, and skeletal muscle and at low levels in the liver, lung, thymus, kidney, and adipose tissue (2–5).

TWEAK is initially expressed as a full-length transmembrane protein of 27 kDa (mTWEAK) from which a soluble variant of 18 kDa (sTWEAK) can be generated intracellularly by proteolytic processing (6). Both isoforms, mTWEAK and sTWEAK, are biologically active and can bind to fibroblast growth factor-inducible 14 (Fn14), its only bona fide signal transducing receptor (6).

Reduced circulating TWEAK (sTWEAK) levels have been found in diseases with increased cardiovascular risk and low-degree chronic inflammation, such as type 2 diabetes, atherosclerosis, or chronic renal failure (3, 7, 8).

Obesity is a highly prevalent chronic disease in which inflammatory events (systemic and local in the adipose tissue) play a key role in its associated comorbidities (9). In obesity, more adipose tissue infiltrating macrophages with an altered polarizing state have been reported (10, 11). An imbalance between M1 (proinflammatory) and M2 (antiinflammatory) macrophage types has been claimed to be an important determinant of the inflammatory component of the adipose tissue in obesity (12–17).

To date, TNF $\alpha$  has focused the attention as a preponderant inflammatory cytokine, with important implications both at local and systemic levels in obesity and related diseases (18). TWEAK and TNF $\alpha$  are cytokines that coexist within the context of obesity, and sTWEAK has been described to interfere with TNF $\alpha$  signaling in cellular systems such as human epithelial cancer cell lines, human synoviocytes, and mouse cerebral cortical neurons (19–21).

The physiological role of sTWEAK within the context of obesity or insulin resistance has been scarcely studied. In this sense, *in vitro* studies have shown that sTWEAK stimulus could regulate preadipocyte differentiation and can exert a weak proinflammatory activity over subcutaneous mature adipocytes without affecting lipolysis or glucose uptake (22–25). On the other hand, studies on the function of sTWEAK in human macrophages have suggested that sTWEAK balances TNF $\alpha$  activity by repressing the production of proinflammatory cytokines and attenuating the transition from innate to adaptive immunity (23).

Taking the above data into consideration and because, to our knowledge, no information exists on circulating sTWEAK in severe obesity, in this study we explored

whether sTWEAK may participate in the inflammatory/antiinflammatory imbalance observed in severe obesity. We show that sTWEAK levels were decreased in severely obese patients and rose after weight loss. We found that in severely obese subjects, the mTWEAK protein expression in sc adipose tissue (SAT) is mainly due to the cells contained in the stromal vascular fraction (SVF) compartment. We also reveal that M2 class macrophages express mTWEAK at higher levels than M1 type. Finally, we report that in human primary cultured adipocytes, sTWEAK down-regulates inflammatory cytokines induced by TNF $\alpha$ , by hampering intracellular signaling events.

## Materials and Methods

### Subjects

Two different cohorts were studied.

#### Cohort 1

Cohort 1 included 23 severely obese subjects and an age- and gender-matched population of 35 overweight subjects who were recruited at the Hospital Clínico de Málaga and Hospital Universitario de Tarragona Joan XXIII (Spain), respectively (Table 1). None of the severely obese subjects were receiving insulin therapy or oral hypoglycemic or hypolipidemic agents. Subjects were of Caucasian origin and had no systemic or infectious disease other than obesity.

#### Cohort 2

A different cohort from the Hospital Clínico de Málaga was included in the study. Twenty-three severely obese patients, who underwent bariatric surgery, were prospectively recruited. Patients were studied before and 6 months after bariatric surgery (Table 2).

Abdominal SAT was obtained from 4 severely obese patients (undergoing bariatric surgery procedures) and from 4 control subjects (undergoing laparoscopic surgery procedures such as hiatus hernia repair or cholecystectomies). Adipocytes and SVF were isolated as described elsewhere (4) from the biopsies of 4 severely obese patients and 4 control patients. Biological samples were frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for later analysis.

The corresponding hospital ethics committees responsible for research approved the study, and informed consent was obtained from all participants.

### Analytical methods

Glucose, cholesterol, and triglyceride plasma levels were determined by a Hitachi 737 autoanalyzer (Roche Molecular Biochemicals, Marburg, Germany) using the standard enzyme methods. High-density lipoprotein cholesterol was quantified after precipitation with polyethylene glycol at room temperature (PEG-6000; Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Germany). Plasma insulin, levels of soluble IL-6, and plasma free fatty acids (FFAs) were measured as described elsewhere (5). TNF $\alpha$  in serum (cohort 1) and in plasma (cohort 2) was measured with the human TNF $\alpha$  ultrasensitive kit (BLK Diagnostics International, Barcelona, Spain). Serum sTWEAK was measured using the hu-

**Table 1.** Clinical and Anthropometrical Characteristics of Cohort 1

	Control (n = 35)	Severely Obese (n = 23)	P Value
Age, y	44.5 ± 8.3	40 ± 10	ns
Gender, n, male/female	23/12	9/14	ns
BMI, kg/m <sup>2</sup>	26.2 ± 3.6	57.4 ± 7.3	<.001
Waist circumference, cm	90.8 ± 13	146.2 ± 23.5	<.001
SBP, mm Hg	122 ± 13	140 ± 23.6	ns
DBP, mm Hg	70.6 ± 9.4	84.5 ± 10.2	.004
Cholesterol, mM	4.8 ± 0.3	5.2 ± 1.1	ns
HDL-cholesterol, mM	1.3 ± 0.3	1 ± 0.6	ns
Triglycerides, mM	1.2 ± 0.7	1.4 ± 0.8	ns
LDL-cholesterol, mM	2.9 ± 0.9	3.5 ± 1.1	ns
Glucose, mM	5.3 ± 0.7	5.6 ± 1	ns
Insulin, μIU/mL	5.9 ± 4.5	31.5 ± 18	<.001
HOMA-IR	1.4 ± 1.1	8.1 ± 5.9	<.001
IL-6, pg/mL	1.9 ± 1.4	6.1 ± 4.5	<.001
TNFα, pg/mL	2.4 ± 1.3	4.1 ± 2.4	.033
sTWEAK, pg/mL	587,8 ± 264.3	252,8 ± 386.5	<.003

Abbreviations: DBP, diastolic blood pressure; ns, not significant; SBP, systolic blood pressure.

man TWEAK instant ELISA kit (Bender Medsystems, Vienna, Austria). Leptin was analyzed using the enzyme immunoassay ELISA kit (Diagnostic Systems Laboratories, Webster, Texas). Adiponectin was analyzed using the enzyme immunoassay ELISA kit (DRG Diagnostics GmbH, Marburg, Germany). Plasma high-sensitive C-reactive protein (CRP) was measured using a highly sensitive immunonephelometry kit (Dade Behring, Marburg, Germany).

### Reagents

TWEAK, TNFα, IL-4, IL-10, and interferon (INF)-γ were purchased from PeproTech Inc (Rocky Hill, New Jersey). Lipopolysaccharide was purchased from Calbiochem (BioNova, Barcelona, Spain). Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) was pur-

chased from Sigma-Aldrich (Barcelona, Spain). The following antibodies were used: antihuman TWEAK/TNFS12 was purchased from R&D Systems (Barcelona, Spain); Fn14; p44/42 (ERK); stress-activated protein kinase (SAPK)/c-Jun N-terminal kinase (JNK); p38 MAPK; phosphorylated (P)-p44/42 (ERK) (Thr202/Tyr204); P-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185); P-p38 MAPK (Thr180/Tyr182); inhibitory-κB (IκB)-α; P-IκBα (Ser32) were obtained from Cell Signaling (Invitrogen, Spain); and anti-β-actin antibody was obtained from Sigma-Aldrich.

### Cell culture and treatments

#### Primary culture of human adipocytes

Human preadipocytes were purchased from the European Collection of Cell Cultures (Salisbury, United Kingdom). Cells

**Table 2.** Clinical and Anthropometrical Characteristics of Cohort 2

	Before Surgery	6 Months After Surgery	P Value <sup>a</sup>	Change, % <sup>b</sup>	Pearson Correlation, % TWEAK <sup>c</sup>
BMI, kg/m <sup>2</sup>	56 ± 6.6	43 ± 6.5	<.001	-24,5 ± 7.1	R = -0.008; P = 0.976
Waist circumference, cm	143 ± 14.6	117,5 ± 13.7	<.001	-18,1 ± 7.4	R = 0.208; P = .342
Cholesterol, mM	4.9 ± 1	3.4 ± 0.69	<.001	-30,8 ± 11.6	R = -0.055; P = 0.802
HDL-cholesterol, mM	1.10 ± 0.3	0.92 ± 0.2	<.001	-13,4 ± 15.3	R = -0.001; P = .998
Triglycerides, mM	1.6 ± 1	1.3 ± 0.5	.010	-7,9 ± 33.1	R = 0.065; P = .770
Glucose, mM	5.6 ± 1	4.8 ± 0.4	<.001	-12,3 ± 15.3	R = 0.029; P = .897
FFAs, mM	0.56 ± 0.24	0.48 ± 0.17	.386	5.4 ± 56.4	R = -0.535; P = .018
Insulin, μIU/mL	28.1 ± 16.4	11.3 ± 4.3	<.001	-51.3 ± 23.9	R = -0.079; P = .734
HOMA-IR	7.2 ± 5	2.5 ± 1	<.001	-58.3 ± 21.8	R = -0.103; P = .665
Leptin, ng/mL	82.8 ± 32.5	34.4 ± 37	<.001	-61.8 ± 25.9	R = -0.075; P = .768
CRP, mg/mL	7 ± 6.2	1.6 ± 4.7	.001	-62,6 ± 32.3	R = -0.015; P = .954
IL-6, pg/mL	3.1 ± 3	1.1 ± 1.7	.012	105.6 ± 767	R = -0.071; P = .786
TNFα, pg/mL <sup>d</sup>	1.5 ± 0.2	1.1 ± 0.2	.033	-17.8 ± 14	R = 0.067; P = .820
sTWEAK, pg/mL	253 ± 110.4	319 ± 157	.029	34.8 ± 53.7	R = 1

Clinical and analytical characteristics (units provided) of the severely obese patients (n = 23) before and 6 months after surgery. Patients were 7 men and 16 women aged 40.2 ± 10 years.

<sup>a</sup> P value for paired Student's *t* test between T = 0 and T = 6.

<sup>b</sup> Percentage of change (T6 - T0/T = 0 \* 100).

<sup>c</sup> Correlation analysis with percentage sTWEAK and clinical and anthropometrical variables R (Pearson correlation coefficient and P value).

<sup>d</sup> Plasma levels.

were differentiated into adipocytes as recommended by the European Collection of Cell Cultures. At day 14 of differentiation, cells were treated with 100 ng/mL TWEAK or left untreated. After 17 hours, the medium was replaced with a fresh medium. Cells were then either left unstimulated or stimulated for 8 hours with 50 ng/mL TNF $\alpha$  or with 50 ng/mL TNF $\alpha$  plus 100 ng/mL sTWEAK. Cells and cell culture supernatant were collected for further processing.

### Human monocyte-derived macrophages

Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated with Ficoll-Hypaque gradients (Amersham Bioscience, Barcelona, Spain). Monocytes were purified from PBMCs by magnetic cell sorting using CD14-microbeads (Milteny Biotech, S.L. Madrid, Spain). M1, M2a(IL-4), and M2c(IL-10) macrophages were generated in vitro according to the literature (11) by incubation of PBMCs in 1000 U/mL IFN $\gamma$ , 10 ng/mL IL-4, and 10 ng/mL IL-10, respectively, for 5–6 days in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum.

In addition, THP-1 cells were polarized to M1, M2a, and M2c as described by Lepur et al (24). After treatments, all cells were collected for further processing.

### Immunoblot analysis

Cellular proteins were submitted to SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and blocked. Blots were developed and quantified as described elsewhere (5).

### Gene expression and relative quantification

RNA was extracted and quantified as described (4, 5). The TaqMan gene expression assays used were as follows: *IL-6* (Hs00985641\_m1); *IL-8* (Hs00174103\_m1), (Hs00605917\_m1), *IL-1 $\beta$*  (Hs01555410\_m1), *IL-10* (Hs00961622\_m1), *TNF $\alpha$*  (Hs00174128\_m1), *TWEAK* (Hs00611242\_m1), *MCP-1* (Hs00234140\_m1), *CD206* (Hs00267207\_m1), *ADIPOQ* (Hs00605917\_m1), *PPAR $\gamma$*  (Hs00234592\_m1), and *PIIA* (Hs99999904\_m1).

### Statistical analysis

For clinical and anthropometrical variables, data are expressed as mean  $\pm$  SD and for in vitro experimental results as mean  $\pm$  SE. Differences in variables before and 6 months after surgery were analyzed by a paired Student's *t* test. Cohen's kappa agreement was calculated to detect positive or negative variations in circulating level changes before and after surgery between sTWEAK and adiponectin.

Differences among control and severely obese subjects were tested with the Mann-Whitney *U* test for nonnormally distributed data or Student's *t* test for normally distributed data. Spearman's correlation coefficient was used to analyze the association between sTWEAK levels and clinical or metabolic parameters. The mixed linear model was used to determine whether any variable was affecting sTWEAK change between 0 and 6 months, considering the measures of each subject as a random effect and the time and the influence of variables as fixed. Gender, age, and homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) were considered to adjust the model. Finally, stepwise linear regression analysis was performed grouping patients at T = 0 from cohort 1 and cohort 2 to determine the independence of the association between metabolic and clinically associated variables and sTWEAK levels.  $P < .05$  was considered significant.

Statistical analysis was performed using version 15 of the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, Chicago, Illinois).

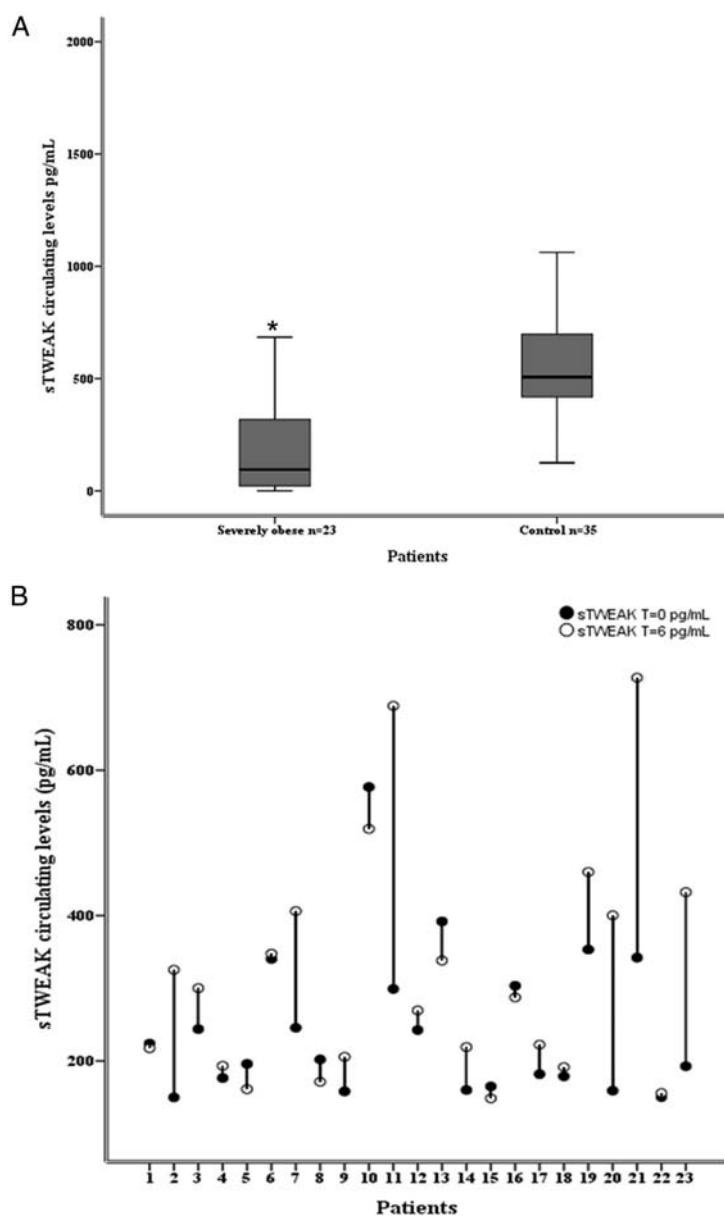
## Results

### sTWEAK serum levels are reduced in severely obese patients and rise after bariatric surgery

When we compared circulating serum sTWEAK levels in the cohort 1 of severely obese subjects vs a comparable control group (Table 1), we observed significantly lower levels of sTWEAK in severely obese patients compared with the control group ( $P < .003$ ) (Figure 1A). No significant differences according to gender were found with respect to sTWEAK levels within the group of severely obese subjects or within the control group ( $P = .297$  and  $P = .063$ , respectively) or after grouping all subjects from cohort 1 ( $P = .414$ ). As expected, severely obese subjects showed a circulating proinflammatory profile with significantly higher levels of IL-6 and TNF $\alpha$  (Table 1).

We also measured sTWEAK in a different cohort before and after bariatric surgery (cohort 2, Table 2). At 6 months after surgery, sTWEAK levels were significantly elevated in 69% of the patients ( $P = .029$ ) when compared with basal levels before weight loss (Table 2 and Figure 1B). No differences were found according to gender with respect to sTWEAK before ( $P = .698$ ) or after surgery ( $P = .878$ ). A mimetic effect of sTWEAK and adiponectin changes after weight loss were observed in some subjects ( $n = 17$ ), with a tendency to be significant ( $\kappa = 0.415$ ;  $P = .087$ ) (25). Other clinical parameters, biochemical (glucose and lipid profile) and inflammatory, were found significantly decreased after surgery (Table 2). Correlation analysis with all studied variables at T = 0 and T = 6 showed that sTWEAK at T = 0 was negatively related to CRP at T = 6 ( $r = -0.537$ ,  $P = .026$ ), and sTWEAK at T = 6 significantly correlated with FFAs at T = 6 ( $r = -0.499$ ,  $P = .025$ ). In a bivariate correlation analysis, the percentage of change of sTWEAK was the only variable that significantly related with the percentage of change of FFA ( $r = -0.535$ ,  $P = .018$ ). Then we performed a paired *t* test to check whether FFA levels change significantly after surgery. Despite a clear trend to be lower, the differences were not statistically significant ( $P = .386$ ). Finally, to test whether changes in FFAs were influencing sTWEAK changes, we used the mixed linear model, and we found that FFAs modulate the expression of sTWEAK ( $P = .021$ ), meaning that an increase of 1 unit (1 mM) of FFAs decreases sTWEAK by  $-202.994$  pg/mL [95% confidence interval (CI) ( $-373.167$ ;  $-32.820$ )].

Bivariate correlation analysis grouping subjects from cohorts 1 and 2 at T = 0 ( $n = 81$ ) showed that circulating sTWEAK correlates negatively with HOMA-IR ( $r =$



**Figure 1.** sTWEAK serum concentrations are decreased in severely obese subjects and rise after bariatric surgery. A, sTWEAK circulating serum levels are reduced in severely obese compared with control subjects (cohort 1). Each box shows the median, quartiles, and extreme. \*,  $P < .003$ . B, Individual sTWEAK levels of cohort 2 patients before and 6 months after surgery.

$-0.286, P = .025$ ), glucose ( $r = -0.306, P = .013$ ), body mass index (BMI) ( $r = -0.399; P = .001$ ), cholesterol ( $r = -0.282, P = .025$ ), and triglycerides ( $r = -0.255, P = .046$ ) and positively with high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol ( $r = 0.299, P = .018$ ). To evaluate the contribution of each variable in determining the sTWEAK

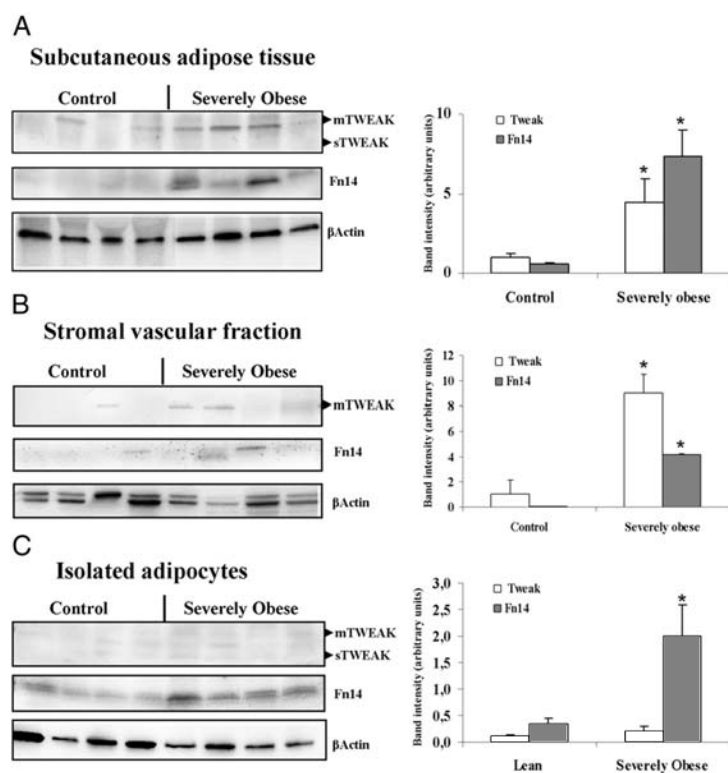
circulating levels, we constructed a multiple regression model with sTWEAK as the dependent variable, including all the above-correlated variables as independent ones, and gender and age as confounding factors. The final model indicated that the increase of 1 unit of BMI (kilograms per square meter) decreases sTWEAK by  $-7.73$  pg/mL (95% CI  $-12.2; -3.26$ ).

Finally, to test the influence of sTWEAK, HOMA-IR, cholesterol, triglycerides, and HDL-cholesterol on BMI index we performed a regression analysis with BMI as the dependent variable. The result showed that BMI was predicted by HOMA-IR [ $B = 1.85$  (CI 1.21; 2.5)] and HDL-cholesterol [ $B = -11.51$  (95% CI  $-19.6; -3.3$ )]. The model had an adjusted  $R^2$  coefficient of 0.478.

#### mTWEAK is predominantly expressed in the SVF and Fn14 in the isolated adipocytes obtained from SAT of severely obese patients

When we determined the protein expression of TWEAK isoforms and Fn14 in the SAT depot of control and severely obese patients, we observed that the expression of mTWEAK and Fn14 was higher in severely obese than in controls, whereas the expression of sTWEAK was undetectable in both groups (Figure 2A). Additionally, as already described, TNF $\alpha$  mRNA levels were up-regulated in the SAT samples of severely obese subjects, confirming the existing local inflammatory background in these patients (Supplemental Figure 1, published on The Endocrine Society's Journals Online web site at <http://jcem.endojournals.org>) (26).

When we analyzed isolated adipocytes and SVF from SAT of severely obese and control subjects, we observed that mTWEAK and Fn14 protein were slightly overexpressed in SVF from severely obese subjects, and, in the adipocyte fraction of these subjects, the Fn14 receptor protein expression was also significantly elevated (Figure 2, B and C).



**Figure 2.** mTWEAK protein expression was increased in the SAT and SVF of severely obese subjects, whereas FN14 was up-regulated in isolated adipocytes. Abdominal SAT was obtained from 4 severely obese patients (4 women, aged  $45.5 \pm 9.7$  years; BMI  $59.1 \pm 4.4$  kg/m<sup>2</sup>) and from 4 control subjects (4 women, aged  $67.7 \pm 14.2$  years; BMI  $24 \pm 0.9$  kg/m<sup>2</sup>); adipocytes (ADI) and SVF were isolated. Fifty micrograms per lane of total protein extract were analyzed by Western blot for both TWEAK isoforms (m/sTWEAK) and Fn14. SAT (A) SVF (B) fractions are shown as are isolated adipocytes (C). Immunoblot and densitometric analyses normalized to  $\beta$ -actin levels are shown. Data are expressed as means  $\pm$  SE. \*,  $P < .05$

### mTWEAK is overexpressed in M2a but not in M2c, M1, or unpolarized M0 monocyte-derived macrophages

We addressed the question of whether M1, M2a, or M2c macrophage types express TWEAK because there was no information regarding this issue, and these macrophage types have been described in the obese setting (16). We first determined TWEAK expression at the mRNA and protein level in THP-1 polarized macrophages to M1, M2a, and M2c. We observed that the M1 type had significantly up-regulated expression of *IL-1 $\beta$* , *IL-8*, *IL-6*, *MCP-1*, and *TNF $\alpha$*  when compared with the unpolarized M0 type; in the M2a macrophage, *IL-10* and *CD206* were significantly up-regulated, whereas M2c showed a similar profile to M0, with a slightly significant up-regulation of *TNF $\alpha$* . Interestingly, *TWEAK* mRNA was markedly up-regulated only in the M2a type (Figure 3A). To rule out that this finding is not cell type restricted, we also obtained M1, M2a and M2c type human monocyte-derived mac-

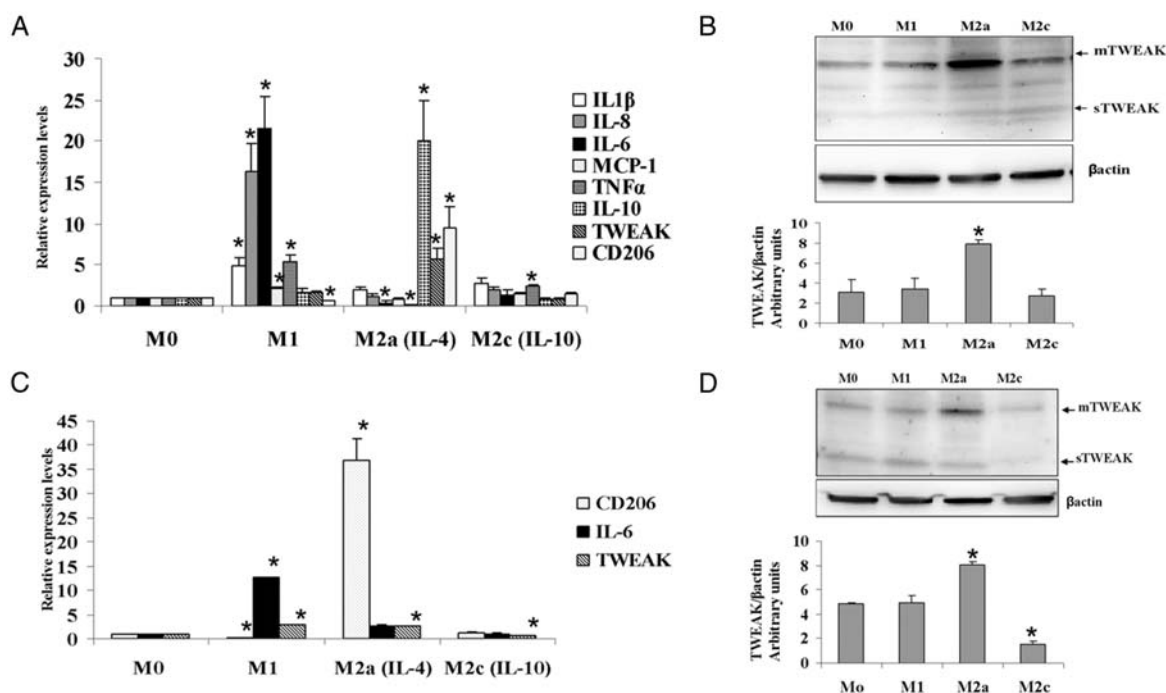
rophages, and we observed that *IL-6* mRNA was overexpressed in the M1 type, whereas *CD206* was overexpressed in the M2a type (Figure 3C). Both M1 and M2a expressed similar mRNA levels of *TWEAK* (Figure 3C).

At the protein level, we showed an overexpression of mTWEAK only in the M2a type, in both THP-1 polarized macrophages, and human monocyte-derived macrophages (Figure 3, B and D). Very low intracellular levels of sTWEAK were detected in each macrophage subtype (Figure 3, B and D).

It is well known that some cytokines may help to polarize macrophages toward M1 and M2 types (12); we then checked whether sTWEAK treatment could have an effect on macrophage polarization. When sTWEAK was added to the polarization treatments of THP-1 cells, no polarizing effect was observed because the mRNA expression profile of the selected cytokines remained the same (Supplemental Figure 2).

### sTWEAK reduces TNF $\alpha$ induction of IL-6 and IL-8 cytokine in primary cultures of human adipocytes

A down-regulation of the TNF $\alpha$  inflammatory effects by sTWEAK have been described in different cell types in the setting of autoimmune and chronic inflammatory diseases (19–21). We then explored whether sTWEAK might also interfere with TNF $\alpha$  proinflammatory effects in adipocytes because the involvement of TNF $\alpha$  in the inflammatory events that take place in obesity is well established (27). For this purpose we analyzed human primary cultured adipocytes using a previously described experimental procedure, in which cells pretreated with sTWEAK or left untreated were further challenged with TNF $\alpha$  (19). When human primary cultured adipocyte cells were pretreated with sTWEAK, we observed a significant reduction ( $P < .005$ ) in the TNF $\alpha$ -induced IL-6 and IL-8 mRNA and protein expression profile (Figure 4, A and B). No changes were observed for adiponectin gene or protein expression (Figure 4, A and B) or for *PPAR $\gamma$*  gene expression (Figure 4A).



**Figure 3.** Overexpression of mTWEAK in M2a polarized THP-1 and human monocyte-derived macrophages. **A**, Inflammatory mRNA profile of M0, M1, and M2 (a and c) polarized cells. To obtain the M0 and M1 types, cells were treated with 100 mM PMA in complete RPMI 1640 medium for 3 days, followed by 3 days without PMA for M0 and with 100 ng/mL lipopolysaccharide for M1. To obtain M2a and M2c macrophage phenotype, cells were treated with 100 mM PMA with the addition of 10 ng/mL IL-4 for M2a or IL-10 for M2c in complete medium. Total RNA was isolated and analyzed by quantitative RT-PCR for the cytokines: *IL-1 $\beta$* , *IL-8*, *IL-6*, *MCP-1*, *TNF $\alpha$* , *IL-10*, and *TWEAK*. (mean  $\pm$  SE of 5 independent experiments). \*,  $P < .05$  with respect to M0. **B**, Western blot analysis of TWEAK isoforms (mTWEAK and sTWEAK) in the 4 polarized types: M0, M1, and M2 (a and c). Protein extracts (20  $\mu$ g/lane) were resolved by SDS-PAGE analyzed by Western blot. Representative immunoblot of 4 independent experiments and densitometry analysis are shown. \*,  $P < .05$  with respect to M0, M1, and M2c. Human monocyte-derived macrophages are shown. **C**, Monocytes from peripheral blood of 4 healthy donors were pooled and cultured 5–6 days in RPMI 1640 medium supplemented with 1000 U/mL IFN $\gamma$ , 10 ng/mL IL-4, and 10 ng/mL IL-10, respectively, for 5–6 days. Real-time PCR confirming human macrophage polarization was performed for M1 and M2 (a and c). \*,  $P < .05$  with respect to M0. **D**, Western blot analysis of TWEAK isoforms (mTWEAK and sTWEAK) in the 4 polarized types: M0, M1, and M2 (a and c). Protein extracts (20  $\mu$ g/lane) were resolved by SDS-PAGE analyzed by Western blot. Representative immunoblot of 2 independent experiments and densitometry analysis are shown. \*,  $P < .05$  with respect to M0 and M1.

Adipocytes remained greater than 90% viable at the end of the different treatments (data not shown).

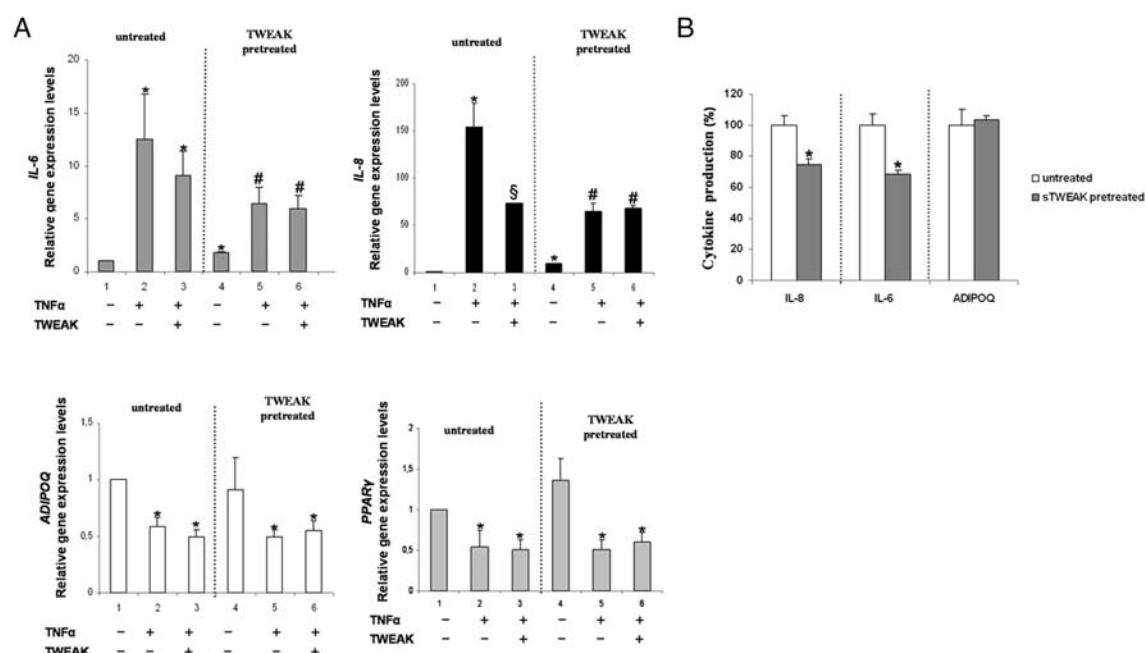
### sTWEAK inhibits TNF $\alpha$ cellular signaling in primary cultures of human adipocytes

To explore a possible inhibition of the TNF $\alpha$  inflammatory cascade by sTWEAK, we analyzed the activation status of the nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and MAPK signaling pathways, well-known mediators of TNF $\alpha$  signaling in adipocytes (27). For this purpose, sTWEAK pretreated primary cultured adipocytes were further challenged with TNF $\alpha$  for 5 seconds, 15 seconds, 30 seconds, 2 hours, and 8 hours. Pretreatment of adipocytes with sTWEAK lowered the activity of NF- $\kappa$ B by significantly reducing I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation at 5 seconds, which was followed, as expected, by a reduction in total I $\kappa$ B $\alpha$ . Regarding MAPK signaling cascades, we observed that

sTWEAK pretreatment significantly reduced the activation of JNK at 10 seconds and 15 seconds, and ERK1/2 protein kinase at 5 and 10 seconds, whereas p38 phosphorylation was only moderately reduced but did not reach significance (Figure 5).

### Discussion

In the present study, we report, for the first time, that sTWEAK circulating levels are significantly decreased in severely obese patients compared with a control group. On the other hand, sTWEAK levels rise after bariatric surgery in 69% of patients. The observation of lower levels of sTWEAK in severely obese subjects is in agreement with decreased sTWEAK circulating levels found in patients with other chronic inflammatory conditions such as



**Figure 4.** sTWEAK reduces TNF $\alpha$ -induced cytokine production in human primary cultured adipocytes. A, sTWEAK inhibits TNF $\alpha$ -induced *IL-6* and *IL-8* mRNA expression in human primary cultured adipocytes but does not alter *ADIPOQ* mRNA expression. Cells untreated or pretreated with sTWEAK (see *Materials and Methods*) were left unstimulated (lanes 1 and 4), treated with 50 ng/mL TNF $\alpha$  (lanes 2 and 5), or treated with 100 ng/mL sTWEAK plus 50 ng/mL TNF $\alpha$  (lanes 3 and 6). \*,  $P < .05$  compared with untreated control (lane 1); # and #,  $P < .05$  compared with treated TNF $\alpha$  (lane 2) (mean  $\pm$  SE of 3 independent experiments). B, sTWEAK reduces TNF $\alpha$ -induced IL-6 or IL-8 protein secretion without affecting adiponectin secretion. Untreated or sTWEAK-pretreated primary cultured adipocytes were stimulated with 50 ng/mL TNF $\alpha$ . Culture media concentrations of IL-6, IL-8, and adiponectin were measured by ELISA. Data represent the percentage of cytokine secretion from untreated vs TWEAK pretreated (mean  $\pm$  SE of 3 independent experiments). \*,  $P < .05$ .

type 2 and type 1 diabetes, heart failure, or atherosclerosis, all of which are associated with an increased cardiovascular risk (3, 7, 28, 29).

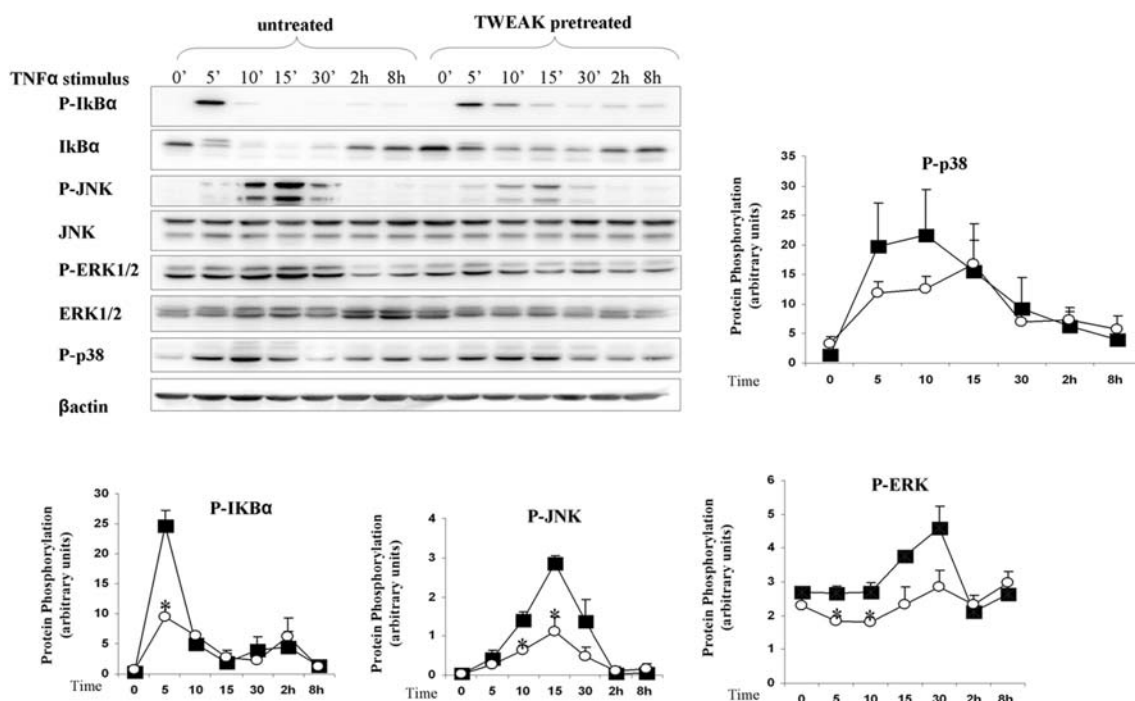
The improvement in the metabolic and inflammatory profile after massive weight loss leads to a recovery of the circulating levels of antiinflammatory molecules; such is the case of adiponectin. Since we observed that sTWEAK levels also rise after surgery, this may suggest that sTWEAK could play an antiinflammatory role. However, to confirm this association, we are aware that a larger sample size will be necessary. Interestingly, we also found that FFA modulates the expression of sTWEAK, which datum may indicate that lipotoxicity could be an important factor that may be regulating sTWEAK levels.

There is no clear explanation for decreased sTWEAK levels in severely obese patients. In general, the mechanisms leading to reduced levels of sTWEAK in diseases associated with cardiovascular risk are not known. In the case of severe obesity, we found that the main determinant of the sTWEAK circulating levels was BMI in an inverse-dependent manner. However, the low levels of mRNA of TWEAK expression detected in subcutaneous and visceral adipose tissue (5) suggest that the contribution of adipose

tissue to sTWEAK levels should be minor. Thereafter the circulating sTWEAK levels may be decreased in severe obesity, possibly as a consequence of the metabolic derangement of other tissues such as vasculature and skeletal muscle, which are both involved in the development of obese comorbidities, and in which TWEAK expressed at higher levels has been found (2).

Many cytokines of the TNF family exist in the form of transmembrane proteins and, after proteolytic cleavage, are secreted as soluble form. Typically both forms activate their receptors efficiently, however, sometimes with a different intensity (30–32). In the case of TWEAK, mTWEAK induces a superior response than sTWEAK in vitro (33).

In this study, we have analyzed the expression of TWEAK protein isoforms in SAT in detail by isolating adipocytes from their SVF cells. Interestingly, adipocytes show negligible m/sTWEAK expression levels but a high expression of their receptor Fn14, whereas the SVF cells express mTWEAK only. Since macrophages are an important component of the SVF cells, this finding may point to macrophages as one of the cells that expresses this cytokine in the adipose tissue of severely obese subjects. This



**Figure 5.** sTWEAK inhibits TNF $\alpha$  cellular signaling in human primary cultured adipocytes. Human primary cultured adipocytes pretreated with sTWEAK or left untreated were stimulated with 50 ng/mL TNF $\alpha$ , and cells were collected at different time points. Protein extracts (20  $\mu$ g/lane) were resolved by SDS-PAGE and analyzed by Western blot. The activation of the NF- $\kappa$ B and MAPK pathways was analyzed using antiphospho- and antitotal I $\kappa$ B $\alpha$ , SAPK/JNK, ERK1/2, and p38 antibodies. Representative immunoblot of 3 independent experiments and densitometric analysis are shown (■, untreated; ○, sTWEAK pretreated). \*,  $P < .05$  with respect to untreated.

observation could be of importance because in severe obesity, this tissue is highly infiltrated with the macrophages (up to 40%) (10).

In obesity, infiltrating macrophages have been described to fit within the M1 and M2 (a and c) type, and the M2 type has been described as the most abundant within the obese adipose tissue (12–17). It has been reported that macrophages can express mTWEAK on their surface (23), but to date, there has been no evidence in favor of a specific subtype. Here we report that M2a human monocyte-derived macrophages express higher levels of mTWEAK when compared with M2c, M1, and M0 type. Since phenotypes of macrophages that express TWEAK are not described in human adipose tissue, the impact of our findings needs to be corroborated in isolated macrophages from severely obese subjects.

It is well known that some cytokines may help to polarize macrophages toward M1 and M2 types (12). In this sense, we found that in our experimental conditions, sTWEAK has no effect over the different macrophage activation states, indicating that the presence of sTWEAK may not affect macrophage phenotype.

In addition, we have shown that treatment of human primary cultured adipocytes with sTWEAK significantly

reduced the production of TNF $\alpha$ -induced IL-6, and IL-8 by down-regulating NF- $\kappa$ B and MAPK pathways with no apparent changes in the adiponectin gene or protein expression. Although it is known that NF- $\kappa$ B regulates the expression of IL-6 and IL-8 by directly binding to their promoter regions (34, 35), it does not regulate adiponectin expression directly. Adiponectin is in part regulated by peroxisomal proliferator-activated receptor- $\gamma$  (36), which does not undergo any change in its expression either after sTWEAK pretreatment. This inhibitory/modulatory effect of sTWEAK on TNF $\alpha$ -activated cells is in line with what occurs in other pathologies such as rheumatoid arthritis (20), ischemic stroke (21), and in several tumor epithelial cells (19), suggesting a broader general competitive behavior of sTWEAK and TNF $\alpha$ . Both sTWEAK and TNF $\alpha$  cytokines coexist within the adipose tissue environment, and both have a proinflammatory potential, although at the same doses, TNF $\alpha$  has a much more potent and rapid inflammatory upshot than sTWEAK (37). In this sense, the low circulating levels of sTWEAK found in obese subjects may contribute to amplify the deleterious effect of TNF $\alpha$  in systemic and local specific tissues.

In conclusion, our observation of lower sTWEAK circulating levels in severely obese subjects may favor the



proinflammatory activity elicited by TNF $\alpha$ . Additionally, in human adipocytes, the modulator effect by sTWEAK over TNF $\alpha$  cytokine production broadens our knowledge of TNF $\alpha$  inflammatory response and could impinge on a better understanding of its adverse metabolic effects in obesity.

## Acknowledgments

We gratefully acknowledge the collaboration of Dr Enric Caubet (Department of Surgery, Hospital St Pau i Sta Tecla, Tarragona, Spain). We thank the BioBanc of HUJ23 for providing human samples and Pilar Hernández (Statistics, Epidemiology, and Bioinformatics Unit, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili of Tarragona, Tarragona, Spain).

Address all correspondence and requests for reprints to: Dr Matilde R. Chacón, Research Unit, University Hospital of Tarragona Joan XXIII, c/o Dr Mallafré Guasch, 4, 43007 Tarragona, Spain. E-mail: mrodriguez.hj23.ics@genat.cat.

This work was supported by projects from the Fondo de Investigación Sanitaria: Grant PI 11/00049 (to M.R.CH), Grant PI08/0733 (to M.R.C.), Grant SAF2012-36186 (to S.F.-V.) and from the Project Consolider Ingenio Grant CSD-2010-00065 (to A.G.-E.). S.F.-V. acknowledges support from the "Miguel Servet" tenure track program (Grant CP10/00438) from the Fondo de Investigación Sanitaria. All support from the Fondo de Investigación Sanitaria are cofinanced by the European Regional Development Fund. A.G.-E., M.R.C., and E.G.-F. are supported by the Research Stabilization Programme of the Instituto de Salud Carlos III. M.R.C. and A.G.-E. are also cofinanced by Institut Català de Salut in Catalonia (Spain). M.M.R. and L.G.-S. are financed by a fellowship "Juan de la Cierva" from the Spanish Ministry of Science and Innovation (Grant JCI-2011-11488 and JCI-2009-04086, respectively). E.-M.-M. is supported by the Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas.

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

## References

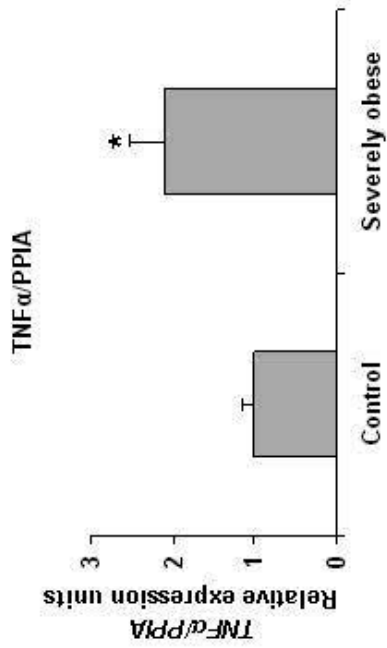
1. Winkles JA. The TWEAK-Fn14 cytokine-receptor axis: discovery, biology and therapeutic targeting. *Nat Rev Drug Discov*. 2008;7:411-425.
2. Chicheportiche Y, Fossati-Jimack L, Moll S, Ibnou-Zekri N, Izui S. Downregulated expression of TWEAK mRNA in acute and chronic inflammatory pathologies. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;279:162.e5.
3. Blanco-Colio LM, Martín-Ventura JL, Muñoz-García B, et al. Identification of soluble tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (sTWEAK) as a possible biomarker of subclinical atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:916-922.
4. Chacón MR, Richard C, Gómez JM, et al. Expression of TWEAK and its receptor Fn14 in human subcutaneous adipose tissue. Relationship with other inflammatory cytokines in obesity. *Cytokine*. 2006;33:129-137.
5. Vendrell J, Maymó-Masip E, Tinahones F, et al. Tumor necrosis-like weak inducer of apoptosis as a pro-inflammatory cytokine in human adipocyte cells: up-regulation in severe obesity is mediated by inflammation but not hypoxia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95:2983-2992.
6. Brown SA, Ghosh A, Winkles JA. Full-length, membrane-anchored TWEAK can function as a juxtacrine signaling molecule and activate the NF- $\kappa$ B pathway. *J Biol Chem*. 2010;285:17432-17441.
7. Kralisch S, Ziegelmeier M, Bachmann A, et al. Serum levels of the atherosclerosis biomarker sTWEAK are decreased in type 2 diabetes and end-stage renal disease. *Atherosclerosis*. 2008;199:440-444.
8. Carrero JJ, Ortiz A, Qureshi AR, et al. Additive effects of soluble TWEAK and inflammation on mortality in hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009;4:110-118.
9. Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9:367-377.
10. Canello R, Henegar C, Viguerie N, et al. Reduction of macrophage infiltration and chemo-attractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes*. 2005;54:2277-2286.
11. Zeyda M, Stulnig TM. Adipose tissue macrophages. *Immunol Lett*. 2007;112:61-67 (review).
12. Martínez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci*. 2008;13:453-461 (review).
13. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*. 2003;3:23-35 (review).
14. Bourlier V, Zakaroff-Girard A, Miranville A, et al. Remodeling phenotype of human subcutaneous adipose tissue macrophages. *Circulation*. 2008;117:806-815.
15. Spencer M, Unal R, Zhu B, et al. Adipose tissue extracellular matrix and vascular abnormalities in obesity and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96:E1990-E1998.
16. Spencer M, Yao-Borengasser A, Unal R, et al. Adipose tissue macrophages in insulin-resistant subjects are associated with collagen VI and fibrosis and demonstrate alternative activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010;299:E1016-E1027.
17. Fuentes L, Wouters K, Hannou SA, et al. Downregulation of the tumour suppressor p16INK4A contributes to the polarisation of human macrophages toward an adipose tissue macrophage (ATM)-like phenotype. *Diabetologia*. 2011;54:3150-3156.
18. Fain JN. Release of inflammatory mediators by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily by the nonfat cells: a review. *Mediators Inflamm*. 2010;2010:5139.
19. Wicovsky A, Salzmann S, Roos C, et al. TNF-like weak inducer of apoptosis inhibits pro-inflammatory TNF receptor-1 signaling. *Cell Death Differ*. 2009;16:1445-1459.
20. Yamana J, Morand EF, Manabu T, et al. Inhibition of TNF-induced IL-6 by the TWEAK-Fn14 interaction in rheumatoid arthritis fibroblast like synoviocytes. *Cell Immunol*. 2012;272:293-298.
21. Echeverry R, Wu F, Haile WB, Wu J, Yepes M. The cytokine tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis and its receptor fibroblast growth factor-inducible 14 have a neuroprotective effect in the central nervous system. *J Neuroinflammation*. 2012;9:45.
22. Tiller G, Fischer-Posovszky P, Laumen H, et al. Effects of TWEAK (TNF superfamily member 12) on differentiation, metabolism, and secretory function of human primary preadipocytes and adipocytes. *Endocrinology*. 2009;125:373-383.
23. Maecker H, Varfolomeev E, Kischkel F, et al. TWEAK attenuates the transition from innate to adaptive immunity. *Cell*. 2005;123:931-944.
24. Lepur A, Carlsson MC, Novak R, Dumić J, Nilsson UJ, Leffler H. Galectin-3 endocytosis by carbohydrate independent and dependent pathways in different macrophage like cell types. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1820:804-818.
25. Altman DG. *Practical Statistics for Medical Research*. New York: Chapman and Hall; 1991.
26. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*. 1995;95:2409-2415.

27. Cawthorn WP, Sethi JK. TNF- $\alpha$  and adipocyte biology. *FEBS Lett.* 2008;582:117–131.
28. Llauradó G, González-Clemente JM, Maymó-Masip E, Subías D, Vendrell J, Chacón MR. Serum levels of TWEAK and scavenger receptor CD163 in type 1 diabetes mellitus: relationship with cardiovascular risk factors. A case-control study. *PLoS One.* 2012;7:e43919.
29. Chorianopoulos E, Rosenberg M, Zugck C, Wolf J, Katus HA, Frey N. Decreased soluble TWEAK levels predict an adverse prognosis in patients with chronic stable heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2009;11:1050–1056.
30. Grell M, Douni E, Wajant H, et al. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell.* 1995;83:793–802.
31. Schneider P, Holler N, Bodmer JL, et al. Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with down-regulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J Exp Med.* 1998;187:1205–1213.
32. Müller N, Wyzgol A, Münkkel S, Pfizenmaier K, Wajant H. Activity of soluble OX40 ligand is enhanced by oligomerization and cell surface immobilization. *FEBS J.* 2008;275:2296–2304.
33. Roos C, Wicovsky A, Müller N, et al. Soluble and transmembrane TNF-like weak inducer of apoptosis differentially activate the classical and noncanonical NF- $\kappa$ B pathway. *J Immunol.* 2010;185:1593–1605.
34. Libermann TA, Baltimore D. Activation of interleukin-6 gene expression through the NF- $\kappa$ B transcription factor. *Mol Cell Biol.* 1990;10:2327–2334.
35. Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, et al. PPAR $\gamma$  ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, adipose-derived protein. *Diabetes.* 2001;50:2094–2099.
36. Hoffmann E, Dittrich-Breiholz O, Holtmann H, Kracht M. Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol.* 2002;72:847–855.
37. Fick A, Lang I, Schäfer V, Seher A, Trebing J, Weisenberger D, Wajant H. Studies of binding of tumor necrosis factor (TNF)-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) to fibroblast growth factor inducible 14 (Fn14). *J Biol Chem.* 2011;287:484–495.



Save the Date for **Endocrine Board Review (EBR)**,  
 September 24–25, 2013, Hyatt Regency New Orleans New Orleans, LA  
[www.endo-society.org/CEU2013](http://www.endo-society.org/CEU2013)

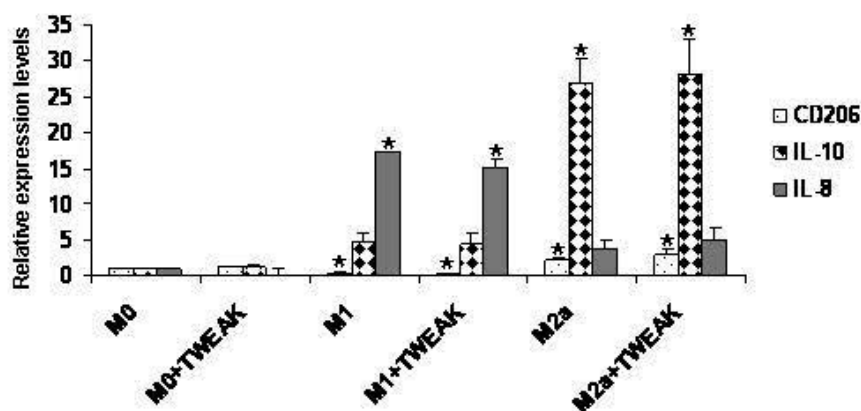
Supplemental Figure 1.



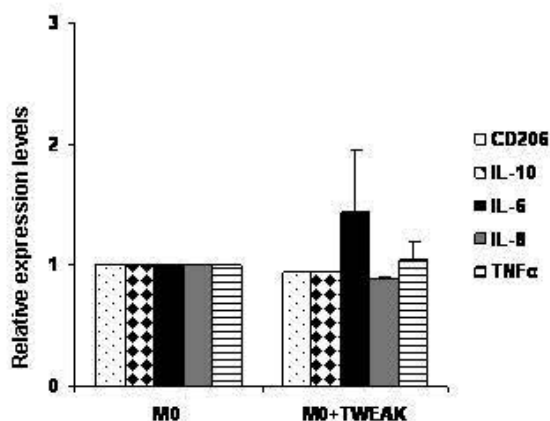
Subcutaneous adipose tissue from severely obese patients shows elevated mRNA levels of TNFα

Supplemental Figure 2

A)



B)



**sTWEAK treatment did not affect the polarization state of macrophages.**

CD206, *IL-10*, *IL-6*, *IL-8* and *TNFα* was measured by qPCR in M0, M1 and M2a macrophages. To evaluate the effect of sTWEAK in macrophage polarization, all macrophage types were cultured in the presence of 20ng/mL sTWEAK during the polarization treatment.  $p < 0.05$  respect to M0. (A) THP-1 polarized macrophages (B) Human monocytes polarized macrophages.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA CITOCINA TWEAK Y DE SU RECEPTOR Fn14 EN EL CONTEXTO DE LA OBESIDAD.

Elsa Maymó Masip

Dipòsit Legal: T 322-2016

## *FE DE ERRATAS*

En la página 89 dice: “*sTWEAK pretreated primary cultured adipocytes were further challenged with TNF $\alpha$  for 5 seconds, 15 seconds, 30 seconds [...] reduced the activation of JNK at 10 seconds and 15 seconds, and ERK1/2 protein kinase at 5 and 10 seconds ...*”

Y debe decir: “*sTWEAK pretreated primary cultured adipocytes were further challenged with TNF $\alpha$  for 5 **minutes**, 15 **minutes**, 30 **minutes** [...] reduced the activation of JNK at 10 **minutes** and 15 **minutes**, and ERK1/2 protein kinase at 5 and 10 **minutes** ...*”

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA CITOCINA TWEAK Y DE SU RECEPTOR Fn14 EN EL CONTEXTO DE LA OBESIDAD.

Elsa Maymó Masip

Dipòsit Legal: T 322-2016

## **RESUMEN RESULTADOS**



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA CITOCINA TWEAK Y DE SU RECEPTOR Fn14 EN EL CONTEXTO DE LA OBESIDAD.

Elsa Maymó Masip

Dipòsit Legal: T 322-2016

## RESUMEN RESULTADOS

### Estudio 1

- El eje TWEAK/Fn14 está sobreexpresado en el tejido adiposo subcutáneo y visceral de pacientes con obesidad severa en paralelo a genes de hipoxia y de estrés de RE.
- La hipoxia y el estrés de RE son estímulos que no regulan la expresión del eje TWEAK/Fn14 ni en el adipocito ni en el macrófago.
- La inflamación local del tejido adiposo podría estar implicada en la regulación de la expresión del eje TWEAK/Fn14 en el tejido adiposo de obesos severos, puesto que un estímulo inflamatorio *in vitro* induce la expresión de TWEAK en el macrófago y de Fn14 en el adipocito, sugiriendo así una acción paracrina de TWEAK sobre el adipocito.
- La citocina TWEAK tiene un efecto proinflamatorio *in vitro* sobre adipocitos humanos.

### Estudio 2

- Los adipocitos de los individuos obesos sobreexpresan Fn14, mientras que la isoforma mTWEAK está sobreexpresada en la FSV.
- La isoforma mTWEAK se expresa mayoritariamente en los macrófagos de tipo M2a.
- En la obesidad severa los niveles circulantes de sTWEAK están disminuidos y aumentan tras la pérdida de peso por cirugía bariátrica.

- sTWEAK modula la expresión y secreción de citocinas inducidas por el TNF $\alpha$  en adipocitos humanos mediante la inhibición de las vías de señalización comúnmente utilizadas por TNF $\alpha$  (NF- $\kappa$ B y MAPK).

# DISCUSIÓN

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA CITOCINA TWEAK Y DE SU RECEPTOR Fn14 EN EL CONTEXTO DE LA OBESIDAD.

Elsa Maymó Masip

Dipòsit Legal: T 322-2016

## DISCUSIÓN

La obesidad y la DMT2 son patologías que están estrechamente relacionadas con la presencia de inflamación crónica de bajo grado<sup>102,210</sup>. Esta evidencia plantea un cambio de comportamiento del tejido adiposo, tanto de los adipocitos maduros como de las células inmunocompetentes de la FSV en la progresión de la obesidad y de la RI. Varias citocinas inflamatorias secretadas por el tejido adiposo, como TNF $\alpha$  o la IL-6, se han descrito como moléculas involucradas en este proceso inflamatorio alterando la señalización de la insulina en los órganos insulino-sensibles. El número de nuevas moléculas que afectan al desequilibrio inflamatorio local y sistémico en la obesidad y la DMT2 es cada vez mayor. En este contexto tan complejo, algunas moléculas pueden exhibir acciones paradójicas o incluso opuestas, dependiendo del tipo celular sobre el cual estén actuando y de las condiciones sistémicas o locales.

TWEAK es una citocina que se expresa en múltiples tejidos humanos a nivel de ARNm, sin embargo, el primer dato de expresión de esta citocina en el tejido adiposo humano de pacientes con obesidad y DMT2 fue publicado por nuestro grupo en el año 2006<sup>36</sup>.

A fin de conocer mejor el papel de la citocina TWEAK en el contexto de la obesidad, nos propusimos profundizar en el conocimiento de estas primeras observaciones para lo cual nos planteamos analizar la expresión génica del eje *TWEAK/Fn14* en biopsias pareadas de TAS y TAV en un contexto más amplio que recogiera los distintos fenotipos asociados a obesidad, incluida la DMT2, en cohortes de sujetos delgados, con sobrepeso, obesos, obesos severos y pacientes con DMT2. Los datos obtenidos ponen en evidencia un patrón de expresión del eje *TWEAK/Fn14* diferente en la cohorte de pacientes que presentan obesidad severa (BMI  $\geq$ 40). Dicha expresión génica sigue un perfecto paralelismo con la expresión de la proteína en el TAS de estos

pacientes, tal y como podemos observar en el segundo estudio presentado. Así, en los pacientes con obesidad severa la expresión de *TWEAK* se mantiene homogénea entre TAS y TAV, mientras que en estos pacientes, el receptor *Fn14* se sobreexpresa en el TAV, posiblemente debido a que el tejido visceral proporciona un ambiente más propicio a la expresión de *Fn14*, ya que es un receptor altamente inducible por múltiples factores de crecimiento y diversas citocinas quizás más presentes en este depósito anatómico.

La expresión proteica de las dos isoformas de *TWEAK* (s*TWEAK* y m*TWEAK*) en adipocitos aislados del TAS fraccionado de obesos severos es casi despreciable; sin embargo detectamos una elevada expresión de *Fn14*. Por otro lado, en la FSV sólo detectamos la isoforma m*TWEAK*. Como los macrófagos son un componente muy importante de la FSV en los pacientes obesos, llegando a representar casi el 40% de las células del tejido adiposo<sup>34</sup>, es probable que éstos sean uno de los tipos celulares que más expresan *TWEAK* en el tejido adiposo de los pacientes con obesidad severa.

Los macrófagos pueden presentar tanto fenotipos proinflamatorios como antiinflamatorios clasificándose en fenotipo M1 y fenotipo M2 respectivamente. Una forma de obtener estos fenotipos *in vitro*, es mediante la estimulación con diversos factores. Así, los macrófagos adquieren el fenotipo M1 después de la estimulación con IFN $\gamma$  solo o en combinación con ligandos de TLR; mientras que los macrófagos adquieren el fenotipo M2 después de la exposición *in vitro* a la IL-4, la IL-13 o la IL-10. Los macrófagos M1 secretan altos niveles de citocinas proinflamatorias IL-6, IL-1 y ROS; mientras que los M2 secretan citocinas esenciales para la resolución de la respuesta inflamatoria. En el tejido adiposo existen varias poblaciones de macrófagos (M1, M2a, M2c) que se encuentran en distintas proporciones según el contexto<sup>50,144,27</sup>. Sin embargo, hasta el momento se desconocía si existe algún subtipo específico de macrófago que exprese *TWEAK* de forma preferente. En este sentido, nuestros resultados tras obtener la polarización *in vitro* de monocitos humanos de sujetos sanos hacia los

diferentes subtipos de macrófagos o bien utilizando la línea celular THP-1, muestran que los macrófagos de tipo M2a expresan más mTWEAK que los subtipos M2c, M1 y M0. Estos datos suman importancia al estudio porque es la primera vez que se identifica un subtipo de macrófago como responsable mayoritario de la expresión de TWEAK. No obstante, debemos ser cautos y corroborar estos resultados en macrófagos aislados de tejido adiposo de pacientes obesos, antes de asegurar sin duda alguna que esta observación también se reproduce en el macrófago residente en el tejido adiposo.

En la literatura, los datos sobre el fenotipo de macrófagos que predomina en el tejido adiposo obeso son controvertidos. En ratones, la mayoría de autores indican que los modelos de ratones obesos presentan más macrófagos de tipo M1 en el tejido adiposo<sup>139</sup>. Pero en la obesidad humana, aunque algunos estudios están de acuerdo con las observaciones en modelos animales<sup>11,219</sup>, otros apuntan a que existe un predominio del fenotipo M2 sobre los demás<sup>212,79,213,27</sup>. Los macrófagos observados en tejido adiposo de los individuos obesos son mayoritariamente de tipo M2, aún así son capaces de producir citocinas inflamatorias que podrían contribuir considerablemente al desarrollo de RI<sup>271</sup>.

La polarización hacia un fenotipo u otro de macrófago, como ya hemos comentado, es debida a la acción de ciertas proteínas inflamatorias sobre dicho tipo celular<sup>85,144</sup>. Siguiendo esta línea, decidimos evaluar la posibilidad de que sTWEAK pudiera ejercer algún efecto polarizador sobre los macrófagos. Utilizando la línea celular THP-1 y tras tratar estas con sTWEAK pudimos observar que no se afecta la expresión de genes marcadores de macrófagos de tipo M1 (TNF, IL-6, IL-1 $\beta$ ) ni M2 (CD206, IL-10), lo que indica que sTWEAK no tiene ningún efecto polarizador ni activador sobre los macrófagos, al menos en las condiciones analizadas en nuestro estudio.

En el tejido adiposo de los individuos obesos coexisten, en el mismo contexto, eventos inflamatorios y un ambiente de hipoxia<sup>175</sup>, generándose como consecuencia de ello, estrés de RE<sup>172</sup>. Uno de



nuestros objetivos fue analizar el papel que podían jugar estos elementos en la desregulación del patrón de expresión del eje *TWEAK/Fn14* en el tejido adiposo de estos pacientes. Para averiguar el grado de hipoxia, estrés de RE y de inflamación del tejido adiposo de nuestros pacientes, analizamos en las biopsias de TAS y TAV de nuestra cohorte la expresión relativa del eje *TWEAK/Fn14* en relación a genes de respuesta a hipoxia, tales como *VEGF*, *GLUT1*, *FLAF*, *HYOU1*, *Visfatin*, *HIF-1 $\alpha$*  y los genes relacionados con el estrés de RE como *GRP78* y *XBP-1*. Se observa una sobreexpresión de todos los genes tanto de hipoxia como de estrés de RE solamente en la cohorte con obesidad severa, tanto en TAS como en TAV, al ser comparada con un grupo control. Estos resultados están en consonancia con otros estudios donde se describe una sobreexpresión de genes relacionados con la hipoxia e inflamación en el contexto de la obesidad humana<sup>175</sup>. No se observan cambios en la expresión de estos mismos genes en biopsias de pacientes con sobrepeso, obesos y delgados. Únicamente el gen *VEGF* destaca por su sobreexpresión en las biopsias tanto de TAS como de TAV de pacientes delgados al ser comparadas con los pacientes con sobrepeso y obesidad.

A pesar de que estos hallazgos puedan parecer contradictorios puesto que *VEGF* aumenta su expresión en respuesta a la hipoxia y a la demanda de un aumento de vascularización tisular, su papel en la obesidad no está claro. Aunque está establecido que la expresión de *VEGF* es necesaria para la expansión del tejido adiposo, existen estudios donde muestran una disminución en la expresión de *VEGF* en el tejido adiposo obeso de ratones<sup>92</sup> y humanos obesos<sup>175,154</sup>. En algunos estudios se sugiere que la sobreexpresión de *VEGF* puede proteger de la hipoxia, de la obesidad y de la RI<sup>224,65</sup>. Halberg y colaboradores apuntan a que en los ratones obesos tienen menos expresión de *VEGF* debido a que el estímulo de hipoxia (*HIF-1*) es insuficiente y por tanto están menos vascularizados<sup>92</sup>. Además, según Hoon-Ki Sung, una expresión de *VEGF* insuficiente en tejido adiposo daría lugar a cascadas señalización que conllevan ciertas complicaciones metabólicas (RI,

acumulación de triglicéridos en hígado, colesterol e inflamación en el tejido adiposo blanco)<sup>218</sup>.

En el caso de la obesidad severa, al tratarse de una situación extrema, en la cual los niveles de hipoxia tisular son probablemente mucho más acentuados que en la obesidad más moderada, observamos claramente un aumento de los genes de hipoxia, y por tanto, hallamos niveles claramente elevados de *VEGF* en el tejido adiposo de estos pacientes.

El hecho de que encontremos algunos de los genes regulados por la hipoxia (*HIF1*, *HYOU1*, *GLUT1*) y genes relacionados con el estrés de RE (*GRP78* y *XBP-1*) sobreexpresados en los depósitos de TAV respecto a los de TAS en obesidad severa podría responder a las diferencias metabólicas que existen entre ambos compartimentos<sup>108</sup>.

El uso de modelos celulares representando los dos tipos celulares mayoritarios en el tejido adiposo, la línea celular de leucemia en humanos (THP-1) para macrófagos<sup>49</sup> y la línea *Simpson-Golabi-Bebmel síndrome* (SGBS) para adipocitos<sup>241</sup>, nos han permitido explorar cómo afectan los eventos de hipoxia y de estrés de RE al eje *TWEAK/Fn14* en dichas células *in vitro*. Mediante la inducción de hipoxia ya sea por deficiencia de oxígeno como químicamente con  $\text{CoCl}_2$  (estabilizador del factor de transcripción HIF-1 $\alpha$ ) y mediante la inducción de estrés de RE con tunicamicina (inhibidor de la glicosilación de proteínas en el RE) comprobamos que ninguno de estos estímulos afecta a la expresión génica ni de *TWEAK* ni de *Fn14* en los tipos celulares analizados. Sin embargo, la hipoxia y el estrés de RE provocan un aumento en el ARNm de la citocina inflamatoria *IL-6*, tanto en el adipocito como en el macrófago.

Dado que la hipoxia y el estrés de RE a su vez regulan la expresión de *IL-6*<sup>63</sup> y que los niveles de *IL-6* circulante están más elevados en nuestra cohorte de pacientes con obesidad severa, decidimos evaluar su efecto sobre adipocitos maduros (línea celular SGBS) y macrófagos (línea celular THP-1) *in vitro*. El estímulo provocado por *IL-6*, produce un incremento de la expresión de ARNm de *TWEAK* en el macrófago y un

aumento de su receptor *Fn14* en el adipocito. Este mismo efecto se observa cuando el estímulo inflamatorio es provocado por  $TNF\alpha$  en los adipocitos o por LPS en los macrófagos. Estos resultados dan pie a plantear que tanto TWEAK como su receptor *Fn14* pueden ser modulados a nivel paracrino mediado por el ambiente inflamatorio del tejido adiposo en el contexto de la obesidad (Figura 18).

Por su parte, TWEAK es una citocina capaz de inducir actividad proinflamatoria en varios tipos de células humanas como son las células endoteliales, células de riñón, sinoviocitos, células musculares, etc<sup>255</sup>. En los adipocitos humanos, un estímulo con TWEAK provoca un moderado efecto proinflamatorio, comparado con el potente efecto proinflamatorio que produce  $TNF\alpha$ , produciendo un aumento en la expresión de las citocinas IL-6 y MCP-1, efecto descrito también por otros autores<sup>223</sup>. Este efecto proinflamatorio parece estar mediado a través de las vías de NF- $\kappa$ B canónica y no canónica. En nuestro trabajo, coincidiendo con el de Tiller y colaboradores<sup>223</sup>, se ha observado una ligera activación de la vía canónica en adipocitos subcutáneos, mientras que la vía no canónica parece que esta preferentemente activada en los adipocitos de origen visceral<sup>235</sup>. Además, en adipocitos subcutáneos hemos observado una inducción moderada de proteínas de la vía de las MAPK (ERK1/2) tras un estímulo con TWEAK, vías implicadas en la regulación de la producción de citocinas. Estas vías también se activan en adipocitos viscerales junto con la vía de p38<sup>235</sup>.

Se sabe que TWEAK puede interferir con varios procesos de diferenciación tales como miogénesis, diferenciación de osteoblastos, condrocitos y en la diferenciación de eritroblastos<sup>255</sup>. En este sentido, otros autores han descrito que TWEAK inhibe la diferenciación de adipocitos en una primera etapa, debido a una rápida reducción de la expresión de factores de transcripción adipogénicos<sup>223,33</sup>.

En cuanto a las funciones metabólicas de los adipocitos maduros como son la captación de glucosa o la lipólisis, los estudios realizados por otros grupos demuestran que TWEAK no tiene efectos significativos en estos procesos<sup>223</sup>. Lo mismo se puede deducir de los estudios de

apoptosis en adipocitos humanos, como pudimos observar en trabajos previos de nuestro grupo de investigación<sup>235</sup>, coincidiendo con datos de otros autores<sup>223</sup>. Así, a pesar de que se ha observado que un estímulo de TWEAK tiene un efecto proapoptótico claro en neuronas, y ciertas líneas celulares tumorales humanas<sup>200</sup>, dicho efecto no se observa en células adiposas.

Por lo tanto, en general, pensamos que el efecto principal de TWEAK sobre los adipocitos parece estar restringido a la inhibición de la diferenciación y a la inducción de una respuesta inflamatoria de forma moderada.

La forma soluble de TWEAK (sTWEAK) ha sido identificada y cuantificada en la circulación sanguínea, describiéndose niveles más bajos en pacientes con aterosclerosis o elevado riesgo CV. Así, por ejemplo, se han descrito niveles circulantes más bajos inversamente relacionados con el grosor íntima-media carotídeo en pacientes asintomáticos<sup>24</sup>, en sujetos con enfermedad arterial coronaria y periférica<sup>160,114</sup>, hipertensión arterial pulmonar<sup>75</sup>; fallo cardíaco<sup>46,187</sup>; aneurisma de aorta abdominal<sup>148</sup>; enfermedad renal crónica<sup>268,267,200,234</sup> y DMT1<sup>137</sup>. Estos datos apuntan a un efecto dual de esta citocina en circunstancias sistémicas distintas. Aparentemente, los niveles circulantes de sTWEAK disminuidos en estas patologías parecen tener un efecto deletéreo sobre el proceso aterosclerótico, o al menos asociadas a él, a pesar de ser una proteína con un carácter proinflamatorio cuando se estudia en otros contextos.

Con esta premisa, decidimos analizar si esta disminución a nivel circulante, era extrapolable a situaciones dismetabólicas de elevado riesgo CV como la obesidad o la DMT2. Para ello, analizamos los valores de la forma soluble de TWEAK (sTWEAK) en el suero de pacientes con obesidad severa observando una disminución en sus niveles circulantes a pesar de mantener niveles más elevados de otras citocinas marcadamente inflamatorias como la IL-6 y el TNF $\alpha$ , tal y como ya han descrito otros autores<sup>143</sup>. En la misma línea, otro trabajo reciente de nuestro grupo, ha puesto de manifiesto la relevancia de los

bajos niveles de sTWEAK como biomarcador predictivo de la DMT2 en una población de alto riesgo CV (cohorte *Predimed*) en la que se evaluó la incidencia de DMT2 durante siete años de seguimiento<sup>58</sup>. En este estudio pudimos observar como los sujetos que habían desarrollado una DMT2 durante el seguimiento, mostraban unos niveles basales más bajos de sTWEAK respecto a los que permanecían sin diabetes. Estos datos junto a estudios transversales previos<sup>129</sup> apoyan la hipótesis de que esta citocina podría tener un efecto “protector” en el desarrollo de DMT2, quizá a través de una mejora del perfil inflamatorio sistémico en estos pacientes. En sujetos de edad avanzada con alto riesgo CV, también se ha observado que niveles reducidos sTWEAK se asocian principalmente con síndrome metabólico, obesidad abdominal, hipertrigliceridemia e hiperglucemia<sup>57</sup>.

La validez de esta hipótesis, viene avalada por el hecho de que estos cambios parecen reversibles, recuperando los niveles de sTWEAK cuando desaparece el evento inductor. Así, pudimos constatar que en pacientes con obesidad severa sometidos a cirugía bariátrica los niveles séricos de sTWEAK aumentan tras la pérdida de peso en una gran proporción de casos. Este incremento está asociado a la mejoría del perfil inflamatorio en estos pacientes, lo que nos induce a pensar en que esta citocina pudiera intervenir de alguna forma en la mejora global del proceso inflamatorio tras la reducción ponderal de estos pacientes. A pesar de que no podemos afirmar sin género de dudas que TWEAK participe directamente como elemento antiinflamatorio en estas circunstancias y se trate tan solo de un efecto secundario a la reducción ponderal, todos los datos apuntados previamente, nos permiten especular sobre un papel “protector” de esta molécula en el contexto de patología con alto riesgo CV.

La fuente principal de producción de esta proteína, es difícil de precisar. Aunque hemos detectado niveles de expresión de TWEAK en tejido adiposo, pensamos que la contribución de este tejido al *pool* circulatorio es baja. Aunque no disponemos de datos sobre la secreción de TWEAK y su paso a la circulación sistémica por parte del tejido adiposo, la baja

expresión relativa de esta molécula en dicho tejido y el hecho de que exista una relación inversa entre la expresión a nivel tisular y los niveles circulantes, apuntan a la existencia de otras fuentes de producción de la misma que podrían ser determinantes para entender esta regulación a nivel sistémico. En este sentido, en la obesidad se producen disfunciones metabólicas en otros tejidos además del adiposo, como puede ser el tejido vascular y el músculo esquelético, donde también se ha descrito que se expresa TWEAK<sup>43</sup> y por tanto podrían ser una fuente importante de sTWEAK circulante mayor que la del tejido adiposo, si bien esto está por demostrar.

Profundizando un poco más sobre este papel presuntamente protector de esta molécula a través de sus efectos mitigantes del ambiente inflamatorio en estas patologías, en nuestros trabajos hemos podido comprobar cómo TWEAK lleva a cabo en parte este proceso a nivel molecular.

Sabíamos que sTWEAK es un regulador de la señalización de TNF $\alpha$ , ya que ambos, TWEAK y TNF $\alpha$ , mediante la unión a sus respectivos receptores señalizan por vías de transducción intracelular comunes<sup>202</sup>. Así, se ha descrito que tanto la isoforma transmembrana mTWEAK como la secretada sTWEAK son activas y señalizan a través de Fn14 pero con distintas intensidades; es decir, mTWEAK sería capaz de inducir una respuesta inflamatoria mayor que la que induce sTWEAK *in vitro*<sup>191</sup>.

Cuando estudiamos el efecto que dicha citocina podría ejercer sobre tipos celulares sometidos a estímulos inflamatorios como los que provoca el TNF $\alpha$  en el contexto de las patologías estudiadas en nuestros trabajos, comprobamos cómo la presencia de sTWEAK tiene un impacto en la respuesta obtenida ante dicho estímulo inflamatorio. En el estudio *in vitro* sobre adipocitos humanos primarios, demostramos que un pretratamiento con sTWEAK tiene un efecto protector sobre la respuesta inflamatoria inducida por TNF $\alpha$ , reduciendo significativamente la producción de IL-6 e IL-8. Estos resultados refuerzan los datos publicados por otros autores en otros tipos celulares:

sinoviocitos de pacientes con artritis reumatoide<sup>261</sup>, neuronas corticales de ratón en isquemia cerebral<sup>62</sup>, líneas celulares epiteliales de tumores humanos<sup>250</sup> y apuntan a la existencia de una competencia en las vías de señalización entre TWEAK y TNF $\alpha$  con una moderación secundaria de la respuesta inflamatoria generalizada. En este sentido, algunos autores han apuntado a la existencia de una contención de las vías de señalización intracelulares a través de NF- $\kappa$ B y de las MAPK, ambas comúnmente utilizadas por TNF $\alpha$ <sup>35</sup> (Figura 18).

Dicho proceso parece afectar esencialmente a proteínas inflamatorias, dejando de lado adipocitocinas antiinflamatorias como la ADIPOQ, sobre la cual no se detectan cambios ni a nivel de expresión génica ni proteica mediados por TWEAK. Esto podría explicarse, en parte por el hecho que la ADIPOQ no está regulada por NF- $\kappa$ B sino por PPAR $\gamma$ <sup>142</sup>. Tan solo existe un estudio donde sí se observa una disminución de los genes PPAR $\gamma$  y ADIPOQ tras estímulos de TWEAK duraderos y con dosis muy altas sobre adipocitos humanos<sup>223</sup>. Sin embargo, ni los tiempos ni las dosis utilizadas en este estudio pueden compararse a las utilizadas en nuestro trabajo, especialmente porque son concentraciones muy elevadas de TWEAK lo cual desdibuja el papel que puede representar en condiciones fisiológicas.

En estudios posteriores, hemos podido comprobar que los mecanismos a través de los cuales sTWEAK ejerce un efecto protector de la RI inducida por el TNF $\alpha$ , no se deben a una competencia con TRAF2 a través de TNFR2, si no a la supresión que ejerce sTWEAK sobre el efecto estimulador de TNF $\alpha$  sobre la quinasa JNK1/2<sup>235</sup>, la cual se halla directamente involucrada en el desarrollo de RI<sup>71</sup>. Dicha acción hemos podido comprobar que está mediada por la fosfatasa PP2A conocida por regular negativamente la señalización de diversas citocinas<sup>235</sup>.

Respecto a la pregunta de cuál es la importancia de TWEAK en la fisiología del tejido adiposo *in vivo*, existen modelos de ratones *knock-out* (KO) para el TWEAK donde se ha estudiado el papel de esta citocina en algunos aspectos del metabolismo del tejido adiposo, aunque algunos datos son controvertidos.

Uno de los estudios publicados recientemente proporciona la primera demostración en ratones *in vivo* de la implicación de la vía TWEAK/Fn14 en la regulación del metabolismo del tejido adiposo en obesidad<sup>19</sup>. Los ratones *knock-out* para TWEAK alimentados con una dieta rica en grasas, a las 17 semanas mostraban una reducción en la acumulación ectópica de lípidos, una mejora en la acción de la insulina y tolerancia a la glucosa a nivel hepático y muscular; así como un menor grado de fibrosis y menor respuesta Th1 en el tejido adiposo gonadal cuando fueron comparados con los salvajes que expresaban TWEAK. Sin embargo, no hubo diferencias en el patrón de expresión de citocinas inflamatorias<sup>19</sup>. Estos resultados solamente pudieron ser observados a partir de las 12-17 semanas, de manera que no se puede descartar el hecho de que el organismo desarrollara algún sistema de compensación cuando no existe TWEAK como sugieren Mittal y colaboradores al observar una sobreexpresión del receptor *Fn14* en los ratones TWEAK-KO<sup>156</sup>, o incluso la señalización independiente de ligando<sup>255</sup>.

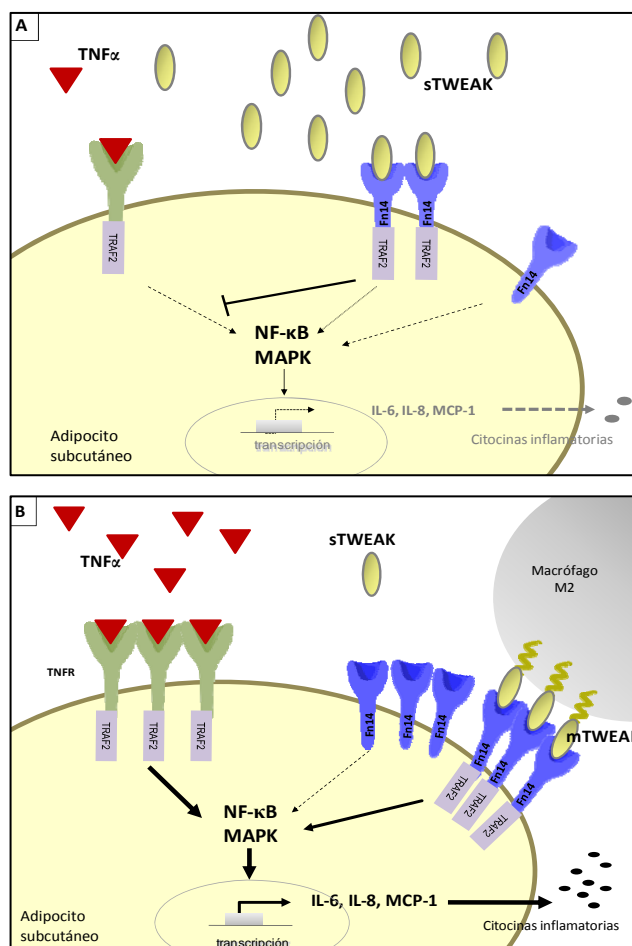
En el modelo de KO para TWEAK donde se analizó la respuesta inmune en tejidos hematopoyéticos<sup>141</sup>, los ratones TWEAK-KO presentaban mayor número de células *natural killer* (NK) que los salvajes por lo que producían una mayor respuesta innata de tipo Th1 frente al LPS (producen más IFN $\gamma$  e IL-12 y menos IL-10), promoviendo así inflamación sistémica frente a un estímulo inflamatorio cuando no se expresa TWEAK. Sin embargo, los ratones TWEAK-KO del estudio de Bennett tenían el mismo número de células NK que los salvajes y menor respuesta de tipo Th1. En ese mismo estudio se confirmó que TWEAK estaba sobreexpresado a nivel local en tejido adiposo, tal y como habíamos descrito en humanos y corroboramos en el presente trabajo.

Los modelos de ratón transgénicos que sobreexpresaban TWEAK en tejido muscular, mostraban que los altos niveles de expresión de TWEAK a nivel local inducían atrofia muscular y disfunciones metabólicas asociadas a la obesidad<sup>201,156</sup>, poniendo en evidencia la capacidad inflamatoria de TWEAK cuando actúa libremente a nivel local.



Este comportamiento complejo de TWEAK en la obesidad animal y humana pone de manifiesto que todavía hay muchos aspectos de la biología de la citocina TWEAK y de su receptor Fn14 que se desconocen. Es importante destacar que, dependiendo de cuál sea la isoforma predominante (soluble o de membrana), así como del contexto en que se encuentren, podemos observar distintos efectos de la citocina.

Lo que sí está claro es que TWEAK tiene un papel importante en la homeostasis y que un desequilibrio en los niveles constitutivos de TWEAK genera respuestas adversas que comprometen tanto al sistema inmune como la fisiología general del organismo.



**Figura 18. Propuesta de modelo de acción de TWEAK y TNF $\alpha$  en la obesidad.**

- A) Estado previo a la obesidad. Los niveles de sTWEAK circulantes son elevados y la unión con su receptor recluta moléculas TRAFs compartidas por TNF $\alpha$ . Como consecuencia, se modulan los posibles efectos producidos tras la activación de TNF $\alpha$  (activación de las vías NF- $\kappa$ B, MAPK).
- B) Obesidad severa. Los bajos niveles circulantes de sTWEAK favorecen que TNF $\alpha$  active de forma preferencial las vías inflamatorias NF- $\kappa$ B y MAPK y se induzca la expresión de citocinas inflamatorias (IL-6, IL-8, MCP-1). Además, como los macrófagos M2 que forman parte de la FSV del tejido adiposo expresan más mTWEAK en la superficie, la unión que resulta de mTWEAK con su receptor también favorece la activación de las vías inflamatorias NF- $\kappa$ B y MAPK.



# CONCLUSIONES

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA CITOCINA TWEAK Y DE SU RECEPTOR Fn14 EN EL CONTEXTO DE LA OBESIDAD.

Elsa Maymó Masip

Dipòsit Legal: T 322-2016

## CONCLUSIONES

- TWEAK es una citocina que puede intervenir en el desequilibrio de la actividad inflamatoria/antiinflamatoria que tiene lugar durante en el desarrollo y la evolución de la obesidad y la DMT2.
- A pesar de la capacidad inflamatoria de la citocina sTWEAK, esta presenta una actividad competitiva con TNF $\alpha$  al interferir con éste en eventos de señalización en el adipocito, mostrando un comportamiento antiinflamatorio en determinado contexto.
- Un desequilibrio de isoformas TWEAK en el contexto de la obesidad severa podría contribuir a potenciar el efecto inflamatorio de TNF $\alpha$  sobre el adipocito.
- La disminución de los niveles de sTWEAK en enfermedades metabólicas con inflamación crónica de bajo grado como la obesidad y la DMT2, se halla asociado a un perfil proinflamatorio favorecido, quizás, por una mayor respuesta inflamatoria del TNF $\alpha$ .

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA CITOCINA TWEAK Y DE SU RECEPTOR Fn14 EN EL CONTEXTO DE LA OBESIDAD.

Elsa Maymó Masip

Dipòsit Legal: T 322-2016

## **BIBLIOGRAFÍA**



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA CITOCINA TWEAK Y DE SU RECEPTOR Fn14 EN EL CONTEXTO DE LA OBESIDAD.

Elsa Maymó Masip

Dipòsit Legal: T 322-2016

## BIBLIOGRAFÍA

1. **Adam-Vizi V, Chinopoulos C.** Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends Pharmacol Sci.* 2006 Dec;27(12)639–45.
2. **Al-Daghri NM, Al-Attas OS, Bindahman LS, Alokail MS, Alkharfy KM, Draz HM, et al.** Soluble CD163 is associated with body mass index and blood pressure in hypertensive obese Saudi patients. *Eur J Clin Invest.* 2012 Nov;42(11)1221–6.
3. **Alexander RW.** Understanding Adipose-derived Stromal Vascular Fraction (AD-SVF) Cell Biology and Use on the Basis of Cellular, Chemical, Structural and Paracrine Components: A Concise Review. *J Prolotherapy.* 2012;4855–69.
4. **Al-Goblan AS, Al-Alfi MA, Khan MZ.** Mechanism linking diabetes mellitus and obesity. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2014 Jan;7587–91.
5. **Almind K, Manieri M, Sivitz WI, Cinti S, Kahn CR.** Ectopic brown adipose tissue in muscle provides a mechanism for differences in risk of metabolic syndrome in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Feb 13;104(7)2366–71.
6. **Ameri H, Liu H, Liu R, Ha Y, Paulucci-Holthauzen A a, Hu S, et al.** TWEAK/Fn14 pathway is a novel mediator of retinal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014 Feb;55(2)801–13.
7. **Amith SR, Jayanth P, Finlay T, Franchuk S, Gilmour A, Abdulkhalek S, et al.** Detection of Neu1 sialidase activity in regulating Toll-like receptor activation. *J Vis Exp.* 2010 Jan;2(43)35–9.
8. **Anderson EJ, Lustig ME, Boyle KE, Woodlief TL, Kane DA, Lin C, et al.** Mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. *J Clin Invest.* 2009 Mar;119(3)573–81.
9. **Ando T, Ichikawa J, Wako M, Hatsushika K, Watanabe Y, Sakuma M, et al.** TWEAK/Fn14 interaction regulates RANTES production, BMP-2-induced differentiation, and RANKL expression in mouse osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Arthritis Res Ther.* 2006 Jan;8(5)R146.
10. **Aranceta J, Pérez Rodrigo C, Serra Majem L, Ribas Barba L, Quiles Izquierdo J, Vioque J, et al.** [Prevalence of obesity in Spain: results of the SEEDO 2000 study]. *Med Clin (Barc).* 2003 May 3;120(16)608–12.

11. **Aron-Wisnewsky J, Tordjman J, Poitou C, Darakhshan F, Hugol D, Basdevant A, et al.** Human adipose tissue macrophages: m1 and m2 cell surface markers in subcutaneous and omental depots and after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 Nov;94(11)4619–23.
12. **Asrani K, Keri RA, Galisteo R, Brown SAN, Morgan SJ, Ghosh A, et al.** The HER2- and heregulin  $\beta$ 1 (HRG)-inducible TNFR superfamily member Fn14 promotes HRG-driven breast cancer cell migration, invasion, and MMP9 expression. *Mol Cancer Res.* 2013 Apr;11(4)393–404.
13. **Aukrust P, Sandberg WJ, Otterdal K, Vinge LE, Gullestad L, Yndestad A, et al.** Tumor necrosis factor superfamily molecules in acute coronary syndromes. *Ann Med.* 2011 Mar;43(2)90–103.
14. **Avignon A, Hokayem M, Bisbal C, Lambert K.** Dietary antioxidants: Do they have a role to play in the ongoing fight against abnormal glucose metabolism? *Nutrition.* 2012 Jul;28(7-8)715–21.
15. **Axelsson J, Møller HJ, Witasp A, Qureshi AR, Carrero JJ, Heimbürger O, et al.** Changes in fat mass correlate with changes in soluble sCD163, a marker of mature macrophages, in patients with CKD. *Am J Kidney Dis.* 2006 Dec;48(6)916–25.
16. **Baeten D, Møller HJ, Delanghe J, Veys EM, Moestrup SK, De Keyser F.** Association of CD163+ macrophages and local production of soluble CD163 with decreased lymphocyte activation in spondylarthropathy synovitis. *Arthritis Rheum.* 2004 May;50(5)1611–23.
17. **Bartelt A, Bruns OT, Reimer R, Hohenberg H, Ittrich H, Peldschus K, et al.** Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat Med.* 2011 Feb;17(2)200–5.
18. **Baxter FO, Came PJ, Abell K, Kedjouar B, Huth M, Rajewsky K, et al.** IKK $\beta$ /2 induces TWEAK and apoptosis in mammary epithelial cells. *Development.* 2006 Sep;133(17)3485–94.
19. **Bennett G, Strissel KJ, DeFuria J, Wang J, Wu D, Burkly LC, et al.** Deletion of TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) protects mice from adipose and systemic impacts of severe obesity. *Obesity (Silver Spring).* 2014 Jun;22(6)1485–94.
20. **Bertin D, Stephan D, Khrestchatisky M, Desplat-Jégo S.** Is TWEAK a Biomarker for Autoimmune/Chronic Inflammatory Diseases? *Front Immunol.* 2013 Jan;4(489).

21. **Bhattacharjee M, Raju R, Radhakrishnan A, Nanjappa V, Muthusamy B, Singh K, et al.** A Bioinformatics Resource for TWEAK-Fn14 Signaling Pathway. *J Signal Transduct.* 2012 Jan;2012(:)376470.
22. **Bisbal C, Lambert K, Avignon A.** Antioxidants and glucose metabolism disorders. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2010 Jul;13(4)439–46.
23. **Blanco-Colio LM.** TWEAK/Fn14 Axis: A Promising Target for the Treatment of Cardiovascular Diseases. *Front Immunol.* 2014 Jan;5(January)3.
24. **Blanco-Colio LM, Martín-Ventura JL, Muñoz-García B, Orbe J, Páramo J a, Michel J-B, et al.** Identification of soluble tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (sTWEAK) as a possible biomarker of subclinical atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Apr;27(4)916–22.
25. **Boden G, Shulman GI.** Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and  $\beta$ -cell dysfunction. 2002;3214–23.
26. **Bonizzi G, Bebien M, Otero DC, Johnson-Vroom KE, Cao Y, Vu D, et al.** Activation of IKK $\alpha$  target genes depends on recognition of specific kappaB binding sites by RelB:p52 dimers. *EMBO J.* 2004 Oct 27;23(21)4202–10.
27. **Bourlier V, Zakaroff-Girard a, Miranville a, De Barros S, Maumus M, Sengenès C, et al.** Remodeling phenotype of human subcutaneous adipose tissue macrophages. *Circulation.* 2008 Feb 12;117(6)806–15.
28. **Bover LC, Cardo-Vila M, Kuniyasu a., Sun J, Rangel R, Takeya M, et al.** A Previously Unrecognized Protein-Protein Interaction between TWEAK and CD163: Potential Biological Implications. *J Immunol.* 2007 Jun 4;178(12)8183–94.
29. **Brown S a N, Cheng E, Williams MS, Winkles J a.** TWEAK-independent Fn14 self-association and NF- $\kappa$ B activation is mediated by the C-terminal region of the Fn14 cytoplasmic domain. *PLoS One.* 2013 Jan;8(6)e65248.
30. **Brown S a N, Ghosh A, Winkles J a.** Full-length, membrane-anchored TWEAK can function as a juxtacrine signaling molecule and activate the NF-kappaB pathway. *J Biol Chem.* 2010 Jun 4;285(23)17432–41.
31. **Brown SAN, Richards CM, Hanscom HN, Feng SY, Winkles JA.** factors 1 , 2 , 3 and 5 and mediates nuclear factor- $\kappa$  B activation. 2003;403395–403.
32. **Brown SAN, Richards CM, Hanscom HN, Feng SY, Winkles JA.** The Fn14 cytoplasmic tail binds tumour-necrosis-factor-receptor-associated factors

- 1, 2, 3 and 5 and mediates nuclear factor-kappaB activation. *Biochem J.* 2003 Apr 15;371(Pt 2)395–403.
33. **Burkly LC, Michaelson JS, Hahm K, Jakubowski A, Zheng TS.** TWEAKing tissue remodeling by a multifunctional cytokine: role of TWEAK/Fn14 pathway in health and disease. *Cytokine.* 2007 Oct;40(1)1–16.
34. **Cancello R, Clément K.** Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. *BJOG.* 2006 Oct;113(10)1141–7.
35. **Cawthorn WP, Sethi JK.** TNF-alpha and adipocyte biology. *FEBS Lett.* 2008 Jan 9;582(1)117–31.
36. **Chacón MR, Richart C, Gómez JM, Megía a, Vilarrasa N, Fernández-Real JM, et al.** Expression of TWEAK and its receptor Fn14 in human subcutaneous adipose tissue. Relationship with other inflammatory cytokines in obesity. *Cytokine.* 2006 Feb 7;33(3)129–37.
37. **Chazaud B.** Macrophages: supportive cells for tissue repair and regeneration. *Immunobiology.* 2014 Mar;219(3)172–8.
38. **Chen T, Guo Z, Li L, Li M, Wang T, Jia R, et al.** TWEAK enhances E-selectin and ICAM-1 expression, and may contribute to the development of cutaneous vasculitis. *PLoS One.* 2013 Jan;8(2)e56830.
39. **Cheng E, Armstrong CL, Galisteo R, Winkles JA.** TWEAK/Fn14 Axis-Targeted Therapeutics: Moving Basic Science Discoveries to the Clinic. *Front Immunol.* 2013 Jan;4(473).
40. **Cheng E, Whitsett TG, Tran NL, Winkles J a.** The TWEAK Receptor Fn14 is a Src-inducible Protein and a Positive Regulator of Src-driven Cell Invasion. *Mol Cancer Res.* 2014 Nov 12;
41. **Cherry EM, Lee DW, Jung J-U, Sitcheran R.** Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) promotes glioma cell invasion through induction of NF- $\kappa$ B-inducing kinase (NIK) and noncanonical NF- $\kappa$ B signaling. *Mol Cancer.* 2015 Jan 27;14(1)9.
42. **Chicheportiche Y, Bourdon PR, Xu H, Hsu YM, Scott H, Hession C, et al.** TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J Biol Chem.* 1997 Dec 19;272(51)32401–10.
43. **Chicheportiche Y, Fossati-Jimack L, Moll S, Ibnou-Zekri N, Izui S.** Down-regulated expression of TWEAK mRNA in acute and chronic inflammatory pathologies. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Dec 9;279(1)162–5.

44. **Chicheportiche Y, Chicheportiche R, Sizing I, Thompson J, Benjamin CB, Ambrose C, et al.** Proinflammatory activity of TWEAK on human dermal fibroblasts and synoviocytes: blocking and enhancing effects of anti-TWEAK monoclonal antibodies. *Arthritis Res.* 2002 Jan;4(2)126–33.
45. **Chorianopoulos E, Jarr K, Steen H, Giannitsis E, Frey N, Katus HA.** Soluble TWEAK is markedly upregulated in patients with ST-elevation myocardial infarction and related to an adverse short-term outcome. *Atherosclerosis.* 2010 Jul;211(1)322–6.
46. **Chorianopoulos E, Rosenberg M, Zugck C, Wolf J, Katus H a, Frey N.** Decreased soluble TWEAK levels predict an adverse prognosis in patients with chronic stable heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2009 Nov;11(11)1050–6.
47. **Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, et al.** Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res.* 2005 Nov;46(11)2347–55.
48. **Dai L, Gu L, Ding C, Qiu L, Di W.** TWEAK promotes ovarian cancer cell metastasis via NF-kappaB pathway activation and VEGF expression. *Cancer Lett.* 2009 Oct 8;283(2)159–67.
49. **Daigneault M, Preston J a, Marriott HM, Whyte MKB, Dockrell DH.** The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS One.* 2010 Jan;5(1)e8668.
50. **Dall'Asta M, Derlindati E, Ardigò D, Zavaroni I, Brighenti F, Del Rio D.** Macrophage polarization: the answer to the diet/inflammation conundrum? *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2012 May;22(5)387–92.
51. **Dalmas E, Clément K, Guerre-Millo M.** Defining macrophage phenotype and function in adipose tissue. *Trends Immunol.* 2011 Jul;32(7)307–14.
52. **Dejardin E, Droin NM, Delhase M, Haas E, Cao Y, Makris C, et al.** The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways. *Immunity.* 2002 Oct;17(4)525–35.
53. **Desplat-Jégo S, Creidy R, Varriale S, Allaire N, Luo Y, Bernard D, et al.** Anti-TWEAK monoclonal antibodies reduce immune cell infiltration in the central nervous system and severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Immunol.* 2005 Oct;117(1)15–23.
54. **Desplat-Jégo S, Feuillet L, Creidy R, Malikova I, Rance R, Khrestchatsky M, et al.** TWEAK is expressed at the cell surface of monocytes during multiple sclerosis. *J Leukoc Biol.* 2009 Jan;85(1)132–5.

55. **Desplat-Jégo S, Varriale S, Creidy R, Terra R, Bernard D, Khrestchatsky M, et al.** TWEAK is expressed by glial cells, induces astrocyte proliferation and increases EAE severity. *J Neuroimmunol.* 2002 Dec;133(1-2)116–23.
56. **Desvergne B.** PPARdelta/beta: the lobbyist switching macrophage allegiance in favor of metabolism. *Cell Metab.* 2008 Jun;7(6)467–9.
57. **Díaz-López A, Bulló M, Chacón MR, Estruch R, Vendrell J, Díez-Espino J, et al.** Reduced circulating sTWEAK levels are associated with metabolic syndrome in elderly individuals at high cardiovascular risk. *Cardiovasc Diabetol.* 2014 Jan;13(1)51.
58. **Díaz-López A, Chacón MR, Bulló M, Maymó-Masip E, Martínez-González M a, Estruch R, et al.** Serum sTWEAK concentrations and risk of developing type 2 diabetes in a high cardiovascular risk population: a nested case-control study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013 Aug;98(8)3482–90.
59. **Dohi T, Burkly LC.** The TWEAK/Fn14 pathway as an aggravating and perpetuating factor in inflammatory diseases: focus on inflammatory bowel diseases. *J Leukoc Biol.* 2012 Aug;92(2)265–79.
60. **Donohue PJ, Richards CM, Brown S a N, Hanscom HN, Buschman J, Thangada S, et al.** TWEAK is an endothelial cell growth and chemotactic factor that also potentiates FGF-2 and VEGF-A mitogenic activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003 Apr 1;23(4)594–600.
61. **Du X, Edelstein D, Obici S, Higham N, Zou M-H, Brownlee M.** Insulin resistance reduces arterial prostacyclin synthase and eNOS activities by increasing endothelial fatty acid oxidation. *J Clin Invest.* 2006 Apr;116(4)1071–80.
62. **Echeverry R, Wu F, Haile WB, Wu J, Yepes M.** The cytokine tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis and its receptor fibroblast growth factor-inducible 14 have a neuroprotective effect in the central nervous system. *J Neuroinflammation.* 2012 Jan;9(1)45.
63. **Eder K, Baffy N, Falus A, Fulop AK.** The major inflammatory mediator interleukin-6 and obesity. *Inflamm Res.* 2009 Nov;58(11)727–36.
64. **Elgazar-Carmon V, Rudich A, Hadad N, Levy R.** Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding. *J Lipid Res.* 2008 Sep;49(9)1894–903.
65. **Elias I, Franckhauser S, Ferré T, Vilà L, Tafuro S, Muñoz S, et al.** Adipose tissue overexpression of vascular endothelial growth factor protects

- against diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2012 Jul;61(7)1801–13.
66. **Ellitus DIM**. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2003 Jan;26 Suppl 1(1)S5–20.
67. **Esteve Ràfols M**. Adipose tissue: cell heterogeneity and functional diversity. *Endocrinol Nutr*. 2014 Feb;61(2)100–12.
68. **Fabrick BO, van Bruggen R, Deng DM, Ligtenberg AJM, Nazmi K, Schornagel K, et al**. The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria. *Blood*. 2009 Jan 22;113(4)887–92.
69. **Fabrick BO, Polfliet MMJ, Vloet RPM, van der Schors RC, Ligtenberg AJM, Weaver LK, et al**. The macrophage CD163 surface glycoprotein is an erythroblast adhesion receptor. *Blood*. 2007 Jun 15;109(12)5223–9.
70. **Felli N, Pedini F, Zeuner A, Petrucci E, Testa U, Conticello C, et al**. Multiple members of the TNF superfamily contribute to IFN-gamma-mediated inhibition of erythropoiesis. *J Immunol*. 2005 Aug 1;175(3)1464–72.
71. **Fernández-Veledo S, Vila-Bedmar R, Nieto-Vazquez I, Lorenzo M**. c-Jun N-terminal kinase 1/2 activation by tumor necrosis factor-alpha induces insulin resistance in human visceral but not subcutaneous adipocytes: reversal by liver X receptor agonists. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009 Sep;94(9)3583–93.
72. **Ferrannini E**. Insulin resistance versus insulin deficiency in non-insulin-dependent diabetes mellitus: problems and prospects. *Endocr Rev*. 1998 Aug;19(4)477–90.
73. **Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A, et al**. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med*. 2009 Aug;15(8)930–9.
74. **Fick A, Lang I, Schäfer V, Seher A, Trebing J, Weisenberger D, et al**. Studies of binding of tumor necrosis factor (TNF)-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) to fibroblast growth factor inducible 14 (Fn14). *J Biol Chem*. 2012 Jan 2;287(1)484–95.
75. **Filusch A, Zelniker T, Baumgärtner C, Eschricht S, Frey N, Katus H a, et al**. Soluble TWEAK predicts hemodynamic impairment and functional capacity in patients with pulmonary arterial hypertension. *Clin Res Cardiol*. 2011 Oct;100(10)879–85.
76. **Frayn KN, Karpe F, Fielding BA, Macdonald IA, Coppack SW**. Integrative physiology of human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2003 Aug;27(8)875–88.



77. **Frayn KN.** Visceral fat and insulin resistance--causative or correlative? *Br J Nutr.* 2000 Mar 9;83 Suppl 1(S1)S71-7.
78. **De Fronzo RA.** Pathogenesis of type 2 Diabetes: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. *Diabetes Rev.* 1997;5(1)177-269.
79. **Fuentes L, Wouters K, Hannou S a., Cudejko C, Rigamonti E, Mayi TH, et al.** Downregulation of the tumour suppressor p16INK4A contributes to the polarisation of human macrophages toward an adipose tissue macrophage (ATM)-like phenotype. *Diabetologia.* 2011 Oct 4;54(12)3150-6.
80. **Geiger K, Leiberer A, Muendlein A, Stark N, Geller-Rhomberg S, Saely CH, et al.** Identification of hypoxia-induced genes in human SGBS adipocytes by microarray analysis. *PLoS One.* 2011 Jan;6(10)e26465.
81. **Gil A, Olza J, Gil-Campos M, Gomez-Llorente C, Aguilera CM.** Is adipose tissue metabolically different at different sites? *Int J Pediatr Obes.* 2011 Sep;6(S1)13-20.
82. **Girgenrath M, Weng S, Kostek C a, Browning B, Wang M, Brown S a N, et al.** TWEAK, via its receptor Fn14, is a novel regulator of mesenchymal progenitor cells and skeletal muscle regeneration. *EMBO J.* 2006 Dec 13;25(24)5826-39.
83. **Glassford AJ, Yue P, Sheikh AY, Chun HJ, Zarafshar S, Chan D a, et al.** HIF-1 regulates hypoxia- and insulin-induced expression of apelin in adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007 Dec;293(6)E1590-6.
84. **Gómez-Hernández A, Perdomo L, Escribano Ó, Benito M.** Role of brown and perivascular adipose tissue in vascular complications due to obesity. *Clin Investig Arterioscler.* 2013;25(1)36-44.
85. **Gordon S.** Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 2003 Jan;3(1)23-35.
86. **Görlach A, Bonello S.** The cross-talk between NF-kappaB and HIF-1: further evidence for a significant liaison. *Biochem J.* 2008 Jun 15;412(3)e17-9.
87. **Van Gorp H, Delputte PL, Nauwynck HJ.** Scavenger receptor CD163, a Jack-of-all-trades and potential target for cell-directed therapy. *Mol Immunol.* 2010 Apr;47(7-8)1650-60.
88. **Grace CS, Goldrick RB.** Fibrinolysis and body build. Interrelationships between blood fibrinolysis, body composition and parameters of lipid and carbohydrate metabolism. *J Atheroscler Res.* 1968;8(4)705-19.

89. **Gray SL, Vidal-Puig AJ.** Adipose Tissue Expandability in the Maintenance of Metabolic Homeostasis. *Nutr Rev.* 2007 Jun 1;65(6)7–12.
90. **Gregor MF, Hotamisligil GS.** Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. *J Lipid Res.* 2007 Sep;48(9)1905–14.
91. **Gurunathan S, Winkles J a, Ghosh S, Hayden MS.** Regulation of fibroblast growth factor-inducible 14 (Fn14) expression levels via ligand-independent lysosomal degradation. *J Biol Chem.* 2014 May 9;289(19)12976–88.
92. **Halberg N, Khan T, Trujillo ME, Wernstedt-Asterholm I, Attie AD, Sherwani S, et al.** Hypoxia-inducible factor 1alpha induces fibrosis and insulin resistance in white adipose tissue. *Mol Cell Biol.* 2009 Aug;29(16)4467–83.
93. **Hamill CA, Michaelson JS, Hahm K, Burkly LC, Kessler JA.** Age-dependent effects of TWEAK/Fn14 receptor activation on neural progenitor cells. *J Neurosci Res.* 2007 Dec;85(16)3535–44.
94. **Harada N, Nakayama M, Nakano H, Fukuchi Y, Yagita H, Okumura K.** Pro-inflammatory effect of TWEAK/Fn14 interaction on human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Dec 6;299(3)488–93.
95. **Harms M, Seale P.** Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med.* 2013 Oct;19(10)1252–63.
96. **Harwood HJ.** The adipocyte as an endocrine organ in the regulation of metabolic homeostasis. *Neuropharmacology.* 2012 Jul;63(1)57–75.
97. **Havel PJ.** Update on Adipocyte Hormones. (8)143–51.
98. **Hocking S, Samocha-Bonet D, Milner K-L, Greenfield JR, Chisholm DJ.** Adiposity and insulin resistance in humans: the role of the different tissue and cellular lipid depots. *Endocr Rev.* 2013 Aug;34(4)463–500.
99. **Holm C.** Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochem Soc Trans.* 2003 Dec;31(Pt 6)1120–4.
100. **Hosogai N, Fukuhara A, Oshima K, Miyata Y, Tanaka S, Segawa K, et al.** Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes.* 2007 Apr;56(4)901–11.
101. **Hosokawa Y, Hosokawa I, Ozaki K, Nakae H, Matsuo T.** Proinflammatory effects of tumour necrosis factor-like weak inducer of

- apoptosis (TWEAK) on human gingival fibroblasts. *Clin Exp Immunol.* 2006 Dec;146(3)540–9.
102. **Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM.** Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science.* 1993 Jan 1;259(5091)87–91.
103. **Hotamisligil GS.** Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* 2006 Dec 14;444(7121)860–7.
104. **Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM.** Rapid Publication Obesity and Insulin Resistance. 1995;95(January)2409–15.
105. **Hotamisligil GS.** Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell.* 2010 Mar 19;140(6)900–17.
106. **Houstis N, Rosen ED, Lander ES.** Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature.* 2006 Apr 13;440(7086)944–8.
107. **Hwang L, Bai C, Sun C.** Prevalence of metabolically healthy obesity and its impacts on incidences of hypertension, diabetes and the metabolic syndrome in Taiwan. 2012;21(510)227–33.
108. **Ibrahim MM.** Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes Rev.* 2010 Jan;11(1)11–8.
109. **Ikner A, Ashkenazi A.** TWEAK induces apoptosis through a death-signaling complex comprising receptor-interacting protein 1 (RIP1), Fas-associated death domain (FADD), and caspase-8. *J Biol Chem.* 2011 Jun 17;286(24)21546–54.
110. **Inoue JI, Ishida T, Tsukamoto N, Kobayashi N, Naito a, Azuma S, et al.** Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) family: adapter proteins that mediate cytokine signaling. *Exp Cell Res.* 2000 Jan 10;254(1)14–24.
111. **Jacobs MD, Harrison SC.** Structure of an IkappaB $\alpha$ /NF-kappaB complex. *Cell.* 1998 Dec 11;95(6)749–58.
112. **Jakubowski A, Ambrose C, Parr M, Lincecum JM, Wang MZ, Zheng TS, et al.** TWEAK induces liver progenitor cell proliferation. *J Clin Invest.* 2005 Sep;115(9)2330–40.
113. **Jakubowski A, Browning B, Lukashev M, Sizing I, Thompson JS, Benjamin CD, et al.** Dual role for TWEAK in angiogenic regulation. *J Cell Sci.* 2002 Jan 15;115(Pt 2)267–74.

114. **Jelić-Ivanović Z, Bujisić N, Spasić S, Bogavac-Stanojević N, Spasojević-Kalimanovska V, Kotur-Stevuljević J.** Circulating sTWEAK improves the prediction of coronary artery disease. *Clin Biochem.* 2009 Sep;42(13-14)1381–6.
115. **Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, Marti HH.** Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O<sub>2</sub> tension. *Am J Physiol.* 1996 Oct;271(4 Pt 1)C1172–80.
116. **Jin L, Nakao A, Nakayama M, Yamaguchi N, Kojima Y, Nakano N, et al.** Induction of RANTES by TWEAK/Fn14 interaction in human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2004 May;122(5)1175–9.
117. **Justo P, Sanz a B, Sanchez-Niño MD, Winkles J a, Lorz C, Egido J, et al.** Cytokine cooperation in renal tubular cell injury: the role of TWEAK. *Kidney Int.* 2006 Nov;70(10)1750–8.
118. **K. Miyazawa, A. Mori, K. Yamamoto and HO.** Constitutive transcription of the human interleukin-6 gene by rheumatoid synoviocytes: spontaneous activation of NF-kappaB and CBF1. *Am J Pathol.* 1998;152(3)793–803.
119. **Kahn SE.** The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2003 Jan;46(1)3–19.
120. **Kamata K, Kamijo S, Nakajima A, Koyanagi A, Kurosawa H, Yagita H, et al.** Involvement of TNF-like weak inducer of apoptosis in the pathogenesis of collagen-induced arthritis. *J Immunol.* 2006 Nov 1;177(9)6433–9.
121. **Kamei N, Tobe K, Suzuki R, Ohsugi M, Watanabe T, Kubota N, et al.** Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *J Biol Chem.* 2006 Sep 8;281(36)26602–14.
122. **Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, et al.** MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest.* 2006 Jun;116(6)1494–505.
123. **Kawakita T, Shiraki K, Yamanaka Y, Yamaguchi Y, Saitou Y, Enokimura N, et al.** Functional expression of TWEAK in human hepatocellular carcinoma: possible implication in cell proliferation and tumor angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Jun 4;318(3)726–33.
124. **Kershaw EE, Flier JS.** Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Jun;89(6)2548–56.

125. **Kim S-H, Kang Y, Kim W, Woo D, Lee Y, Kim D-I, et al.** TWEAK can induce pro-inflammatory cytokines and matrix metalloproteinase-9 in macrophages. *Circ J.* 2004 Apr;68(4)396–9.
126. **Knudsen TB, Gustafson P, Kronborg G, Kristiansen TB, Moestrup SK, Nielsen JO, et al.** Predictive value of soluble haemoglobin scavenger receptor CD163 serum levels for survival in verified tuberculosis patients. *Clin Microbiol Infect.* 2005 Sep;11(9)730–5.
127. **Kowal-Bielecka O, Bielecki M, Guiducci S, Trzcinska-Butkiewicz B, Michalska-Jakubus M, Matucci-Cerinic M, et al.** High serum sCD163/sTWEAK ratio is associated with lower risk of digital ulcers but more severe skin disease in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther.* 2013 Jan;15(3)R69.
128. **Kraakman MJ, Murphy AJ, Jandeleit-Dahm K, Kammoun HL.** Macrophage polarization in obesity and type 2 diabetes: weighing down our understanding of macrophage function? *Front Immunol.* 2014 Jan;(5)470.
129. **Kralisch S, Ziegelmeier M, Bachmann A, Seeger J, Lössner U, Blüher M, et al.** Serum levels of the atherosclerosis biomarker sTWEAK are decreased in type 2 diabetes and end-stage renal disease. *Atherosclerosis.* 2008 Aug;199(2)440–4.
130. **Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, Law SK, et al.** Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature.* 2001 Jan 11;409(6817)198–201.
131. **Van Kuijk a WR, Wijbrandts C a, Vinkenoog M, Zheng TS, Reedquist K a, Tak PP.** TWEAK and its receptor Fn14 in the synovium of patients with rheumatoid arthritis compared to psoriatic arthritis and its response to tumour necrosis factor blockade. *Ann Rheum Dis.* 2010 Jan;69(1)301–4.
132. **Kumar M, Makonchuk DY, Li H, Mittal A, Kumar A.** TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) activates proinflammatory signaling pathways and gene expression through the activation of TGF-beta-activated kinase 1. *J Immunol.* 2009 Feb 15;182(4)2439–48.
133. **Lawrence T.** The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009 Dec;1(6)a001651.
134. **Lawrence T, Gilroy DW.** Chronic inflammation: a failure of resolution? *Int J Exp Pathol.* 2007 Apr;88(2)85–94.
135. **Lemieux I, Pascot A, Prud D, Alméras N, Bogaty P, Nadeau A, et al.** Atherosclerosis and Lipoproteins Elevated C-Reactive Protein Another Component of the Atherothrombotic Profile of Abdominal Obesity. 2001;

136. **Lidell ME, Betz MJ, Dahlqvist Leinhard O, Heglind M, Elander L, Slawik M, et al.** Evidence for two types of brown adipose tissue in humans. *Nat Med.* 2013 May;19(5)631–4.
137. **Llauradó G, González-Clemente J-M, Maymó-Masip E, Subías D, Vendrell J, Chacón MR.** Serum levels of TWEAK and scavenger receptor CD163 in type 1 diabetes mellitus: relationship with cardiovascular risk factors. a case-control study. *PLoS One.* 2012 Jan;7(8)e43919.
138. **Lolmède K, Durand de Saint Front V, Galitzky J, Lafontan M, Bouloumié A.** Effects of hypoxia on the expression of proangiogenic factors in differentiated 3T3-F442A adipocytes. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2003 Oct;27(10)1187–95.
139. **Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR.** Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest.* 2007 Jan;117(1)175–84.
140. **Lynch CN, Wang YC, Lund JK, Chen YW, Leal J a., Wiley SR.** TWEAK induces angiogenesis and proliferation of endothelial cells. *J Biol Chem.* 1999 Mar 26;274(13)8455–9.
141. **Maecker H, Varfolomeev E, Kischkel F, Lawrence D, LeBlanc H, Lee W, et al.** TWEAK attenuates the transition from innate to adaptive immunity. *Cell.* 2005 Dec 2;123(5)931–44.
142. **Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishida K, et al.** PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes.* 2001 Sep;50(9)2094–9.
143. **Makki K, Froguel P, Wolowczuk I.** Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines, and chemokines. *ISRN Inflamm.* 2013 Dec 22;2013139239.
144. **Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M.** The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 2004 Dec;25(12)677–86.
145. **De Marchi E, Baldassari F, Bononi A, Wieckowski MR, Pinton P.** Oxidative stress in cardiovascular diseases and obesity: role of p66Shc and protein kinase C. *Oxid Med Cell Longev.* 2013 Jan;2013564961.
146. **Marsters S a., Sheridan JP, Pitti RM, Brush J, Goddard A, Ashkenazi A.** Identification of a ligand for the death-domain-containing receptor Apo3. *Curr Biol.* 1998 Apr 23;8(9)525–8.
147. **Martínez J, Torres PV.** Los ácidos grasos y la lipotoxicidad: implicaciones metabólicas. 2013;565–18.

148. **Martín-Ventura JL, Lindholt JS, Moreno J a, Vega de Céniga M, Meilhac O, Michel JB, et al.** Soluble TWEAK plasma levels predict expansion of human abdominal aortic aneurysms. *Atherosclerosis*. 2011 Feb;214(2)486–9.
149. **Matsushima a., Kaisho T, Rennert PD, Nakano H, Kurosawa K, Uchida D, et al.** Essential role of nuclear factor (NF)-kappaB-inducing kinase and inhibitor of kappaB (IkappaB) kinase alpha in NF-kappaB activation through lymphotoxin beta receptor, but not through tumor necrosis factor receptor I. *J Exp Med*. 2001 Mar 5;193(5)631–6.
150. **Matsushita N, Kashiwagi M, Wait R, Nagayoshi R, Nakamura M, Matsuda T, et al.** Elevated levels of soluble CD163 in sera and fluids from rheumatoid arthritis patients and inhibition of the shedding of CD163 by TIMP-3. *Clin Exp Immunol*. 2002 Oct;130(1)156–61.
151. **Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC.** Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985 Jul;28(7)412–9.
152. **Mazzatti D, Lim F-L, O'Hara A, Wood IS, Trayhurn P.** A microarray analysis of the hypoxia-induced modulation of gene expression in human adipocytes. *Arch Physiol Biochem*. 2012 Jul;118(3)112–20.
153. **Michaelson JS, Cho S, Browning B, Zheng TS, Lincecum JM, Wang MZ, et al.** Tweak induces mammary epithelial branching morphogenesis. *Oncogene*. 2005 Apr 14;24(16)2613–24.
154. **Miranda M, Escoté X, Ceperuelo-Mallafre V, Megía a, Caubet E, Näf S, et al.** Relation between human LPIN1, hypoxia and endoplasmic reticulum stress genes in subcutaneous and visceral adipose tissue. *Int J Obes (Lond)*. 2010 Apr;34(4)679–86.
155. **Misra A, Vikram NK.** Clinical and pathophysiological consequences of abdominal adiposity and abdominal adipose tissue depots. *Nutrition*. 2003 May;19(5)457–66.
156. **Mittal A, Bhatnagar S, Kumar A, Lach-Trifilieff E, Wauters S, Li H, et al.** The TWEAK-Fn14 system is a critical regulator of denervation-induced skeletal muscle atrophy in mice. *J Cell Biol*. 2010 Mar 22;188(6)833–49.
157. **Møller HJ.** Soluble CD163. *Scand J Clin Lab Invest*. 2012 Feb;72(1)1–13.
158. **Møller HJ, Grønbaek H, Schiødt F V, Holland-Fischer P, Schilsky M, Munoz S, et al.** Soluble CD163 from activated macrophages predicts mortality in acute liver failure. *J Hepatol*. 2007 Nov;47(5)671–6.

159. **Møller HJ, Peterslund NA, Graversen JH, Moestrup SK.** Identification of the hemoglobin scavenger receptor/CD163 as a natural soluble protein in plasma. *Blood*. 2002 Jan 1;99(1)378–80.
160. **Moreno J a, Dejouvencel T, Labreuche J, Smadja DM, Dussiot M, Martín-Ventura JL, et al.** Peripheral artery disease is associated with a high CD163/TWEAK plasma ratio. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010 Jun;30(6)1253–62.
161. **Moreno J a, Muñoz-García B, Martín-Ventura JL, Madrigal-Matute J, Orbe J, Páramo J a, et al.** The CD163-expressing macrophages recognize and internalize TWEAK: potential consequences in atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2009 Nov;207(1)103–10.
162. **Moreno J a, Muñoz-García B, Martín-Ventura JL, Madrigal-Matute J, Orbe J, Páramo J a, et al.** The CD163-expressing macrophages recognize and internalize TWEAK: potential consequences in atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2009 Nov;207(1)103–10.
163. **Morrish NJ, Wang SL, Stevens LK, Fuller JH, Keen H.** Mortality and causes of death in the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes. *Diabetologia*. 2001 Sep;44 Suppl 2S14–21.
164. **Mosser DM, Edwards JP.** Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 2008 Dec;8(12)958–69.
165. **Mueller a M, Pedré X, Kleiter I, Hornberg M, Steinbrecher a, Giegerich G.** Targeting fibroblast growth factor-inducible-14 signaling protects from chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. 2005 Mar;159(1-2)55–65.
166. **Nakayama M, Kayagaki N, Yamaguchi N, Okumura K, Yagita H.** Involvement of TWEAK in interferon gamma-stimulated monocyte cytotoxicity. *J Exp Med*. 2000 Nov 6;192(9)1373–80.
167. **Novack DV, Yin L, Hagen-Stapleton A, Schreiber RD, Goeddel D V, Ross FP, et al.** The IkappaB function of NF-kappaB2 p100 controls stimulated osteoclastogenesis. *J Exp Med*. 2003 Sep 1;198(5)771–81.
168. **Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Goforth MH, Morel CR, Subramanian V, Mukundan L, et al.** Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature*. 2007 Jun 28;447(7148)1116–20.
169. **Oh YS.** Mechanistic insights into pancreatic beta-cell mass regulation by glucose and free fatty acids. *Anat Cell Biol*. 2015 Mar;48(1)16–24.



170. **Olefsky JM, Glass CK.** Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu. Rev. Physiol.* 2010. 72: 219–46.
171. **Organización mundial de la Salud.** Obesidad y sobrepeso. Nota descriptiva nº311. 2015;
172. **Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee A-H, Iwakoshi NN, Ozdelen E, et al.** Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science.* 2004 Oct 15;306(5695)457–61.
173. **Park J-S, Kwok S-K, Lim M-A, Oh H-J, Kim E-K, Jhun J-Y, et al.** TWEAK promotes osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis. *Am J Pathol.* 2013 Sep;183(3)857–67.
174. **Parkner T, Sørensen LP, Nielsen a R, Fischer CP, Bibby BM, Nielsen S, et al.** Soluble CD163: a biomarker linking macrophages and insulin resistance. *Diabetologia.* 2012 Jun;55(6)1856–62.
175. **Pasarica M, Sereda OR, Redman LM, Albarado DC, Hymel DT, Roan LE, et al.** Reduced adipose tissue oxygenation in human obesity: evidence for rarefaction, macrophage chemotaxis, and inflammation without an angiogenic response. *Diabetes.* 2009 Mar;58(3)718–25.
176. **Perper SJ, Browning B, Burkly LC, Weng S, Gao C, Giza K, et al.** TWEAK is a novel arthritogenic mediator. *J Immunol.* 2006 Aug 15;177(4)2610–20.
177. **Petrovic N, Walden TB, Shabalina IG, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J.** Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocyt. *J Biol Chem.* 2010 Mar 5;285(10)7153–64.
178. **Pihl E, Zilmer K, Kullisaar T, Kairane C, Mägi a, Zilmer M.** Atherogenic inflammatory and oxidative stress markers in relation to overweight values in male former athletes. *Int J Obes (Lond).* 2006 Jan;30(1)141–6.
179. **Pischon T, Boeing H, Hoffmann K, Bergmann M, Schulze MB, Overvad K, et al.** General and abdominal adiposity and risk of death in Europe. *N Engl J Med.* 2008 Nov 13;359(20)2105–20.
180. **Polavarapu R, Gongora MC, Winkles J a, Yepes M.** Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis increases the permeability of the neurovascular unit through nuclear factor-kappa B pathway activation. *J Neurosci.* 2005 Nov 2;25(44)10094–100.

181. **Petrovita I, Zhang W, Burkly L, Hahm K, Lincecum J, Wang MZ, et al.** Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis-induced neurodegeneration. *J Neurosci.* 2004 Sep 22;24(38)8237–44.
182. **Price GM, Uauy R, Breeze E, Bulpitt CJ, Fletcher AE.** Weight, shape, and mortality risk in older persons: elevated waist-hip ratio, not high body mass index, is associated with a greater risk of death. *Am J Clin Nutr.* 2006 Aug;84(2)449–60.
183. **Rahman A, Anwar KN, True AL, Malik AB.** Thrombin-induced p65 homodimer binding to downstream NF-kappa B site of the promoter mediates endothelial ICAM-1 expression and neutrophil adhesion. *J Immunol.* 1999 May 1;162(9)5466–76.
184. **Ramalho-Santos M, Yoon S, Matsuzaki Y, Mulligan RC, Melton DA.** “Stemness”: transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. *Science.* 2002 Oct 18;298(5593)597–600.
185. **Rausch ME, Weisberg S, Vardhana P, Tortoriello D V.** Obesity in C57BL/6J mice is characterized by adipose tissue hypoxia and cytotoxic T-cell infiltration. *Int J Obes (Lond).* 2008 Mar;32(3)451–63.
186. **Regazzetti C, Peraldi P, Grémeaux T, Najem-Lendom R, Ben-Sahra I, Cormont M, et al.** Hypoxia decreases insulin signaling pathways in adipocytes. *Diabetes.* 2009 Jan;58(1)95–103.
187. **Richter B, Rychli K, Hohensinner PJ, Berger R, Mörtl D, Neuhold S, et al.** Differences in the predictive value of tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) in advanced ischemic and non-ischemic heart failure. *Atherosclerosis.* 2010 Dec;213(2)545–8.
188. **Robertson RP.** Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J Biol Chem.* 2004 Oct 8;279(41)42351–4.
189. **Roglic G, Unwin N, Bennett PH, Mathers C, Tuomilehto J, Nag S, et al.** The burden of mortality attributable to diabetes: realistic estimates for the year 2000. *Diabetes Care.* 2005 Sep;28(9)2130–5.
190. **Romacho T, Elsen M, Röhrborn D, Eckel J.** Adipose tissue and its role in organ crosstalk. *Acta Physiol (Oxf).* 2014 Apr;210(4)733–53.
191. **Roos C, Wicovsky A, Müller N, Salzmann S, Rosenthal T, Kalthoff H, et al.** Soluble and transmembrane TNF-like weak inducer of apoptosis differentially activate the classical and noncanonical NF-kappa B pathway. *J Immunol.* 2010 Aug 1;185(3)1593–605.

192. **Ros Pérez M, Medina-Gómez G.** [Obesity, adipogenesis and insulin resistance]. *Endocrinol Nutr.* 2011;58(7)360–9.
193. **Ros Pérez M, Medina-Gómez G.** [Obesity, adipogenesis and insulin resistance]. *Endocrinol Nutr.* 2011;58(7)360–9.
194. **Sabour Alaoui S, Dessirier V, de Araujo E, Alexaki V-I, Pelekanou V, Lkhider M, et al.** TWEAK affects keratinocyte G2/M growth arrest and induces apoptosis through the translocation of the AIF protein to the nucleus. *PLoS One.* 2012 Jan;7(3)e33609.
195. **Sacks H, Symonds ME.** Anatomical locations of human brown adipose tissue: functional relevance and implications in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes.* 2013 Jun;62(6)1783–90.
196. **Salans LB, Cushman SW, Weismann RE.** Studies of human adipose tissue. Adipose cell size and number in nonobese and obese patients. *J Clin Invest.* 1973 Apr;52(4)929–41.
197. **Sanz AB, Izquierdo MC, Sanchez-Niño MD, Ucero AC, Egido J, Ruiz-Ortega M, et al.** TWEAK and the progression of renal disease: clinical translation. *Nephrol Dial Transplant.* 2014 Mar;29 Suppl 1i54–i62.
198. **Sanz AB, Sanchez-Niño MD, Izquierdo MC, Jakubowski A, Justo P, Blanco-Colio LM, et al.** Tweak induces proliferation in renal tubular epithelium: a role in uninephrectomy induced renal hyperplasia. *J Cell Mol Med.* 2009 Sep;13(9B)3329–42.
199. **Sanz AB, Aroeira LS, Bellon T, del Peso G, Jimenez-Heffernan J, Santamaria B, et al.** TWEAK promotes peritoneal inflammation. *PLoS One.* 2014 Jan;9(3)e90399.
200. **Sanz AB, Sanchez-Niño MD, Ortiz A.** TWEAK, a multifunctional cytokine in kidney injury. *Kidney Int.* 2011 Oct;80(7)708–18.
201. **Sato S, Ogura Y, Tajirishi MM, Kumar A.** Elevated levels of TWEAK in skeletal muscle promote visceral obesity, insulin resistance, and metabolic dysfunction. *FASEB J.* 2015 Mar;29(3)988–1002.
202. **Schneider P, Schwenzler R, Haas E, Mühlenbeck F, Schubert G, Scheurich P, et al.** TWEAK can induce cell death via endogenous TNF and TNF receptor 1. *Eur J Immunol.* 1999 Jun;29(6)1785–92.
203. **Seale P, Bjork B, Yang W, Kajimura S, Chin S, Kuang S, et al.** PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature.* 2008 Aug 21;454(7207)961–7.

204. **Segawa K, Fukuhara A, Hosogai N, Morita K, Okuno Y, Tanaka M, et al.** Visfatin in adipocytes is upregulated by hypoxia through HIF1alpha-dependent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Oct 27;349(3):875–82.
205. **Semenza GL.** HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr Opin Cell Biol.* 2001 Apr;13(2):167–71.
206. **Senftleben U, Cao Y, Xiao G, Greten FR, Krähn G, Bonizzi G, et al.** Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science.* 2001 Aug 24;293(5534):1495–9.
207. **Serafini B, Magliozzi R, Rosicarelli B, Reynolds R, Zheng TS, Aloisi F.** Expression of TWEAK and its receptor Fn14 in the multiple sclerosis brain: implications for inflammatory tissue injury. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2008 Dec;67(12):1137–48.
208. **Shakeri-Manesch S, Zeyda M, Huber J, Ludvik B, Prager G, Stulnig TM.** Diminished upregulation of visceral adipose heme oxygenase-1 correlates with waist-to-hip ratio and insulin resistance. *Int J Obes (Lond).* 2009 Nov;33(11):1257–64.
209. **Shanik MH, Xu Y, Skrha J, Dankner R, Zick Y, Roth J.** Insulin resistance and hyperinsulinemia: is hyperinsulinemia the cart or the horse? *Diabetes Care.* 2008 Feb;31 Suppl 2:S262–8.
210. **Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB.** Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest.* 2006 Jul;116(7):1793–801.
211. **Soriguer F, Goday a, Bosch-Comas a, Bordiú E, Calle-Pascual a, Carmena R, et al.** Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the Di@bet.es Study. *Diabetologia.* 2012 Jan;55(1):88–93.
212. **Spencer M, Unal R, Zhu B, Rasouli N, McGehee RE, Peterson C a, et al.** Adipose tissue extracellular matrix and vascular abnormalities in obesity and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 Dec;96(12):E1990–8.
213. **Spencer M, Yao-Borengasser A, Unal R, Rasouli N, Gurley CM, Zhu B, et al.** Adipose tissue macrophages in insulin-resistant subjects are associated with collagen VI and fibrosis and demonstrate alternative activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010 Dec;299(6):E1016–27.
214. **Sporrer D, Weber M, Wanninger J, Weigert J, Neumeier M, Stögbauer F, et al.** Adiponectin downregulates CD163 whose cellular and soluble forms are elevated in obesity. *Eur J Clin Invest.* 2009 Aug;39(8):671–9.

215. **Srivastava AK, Qin X, Wedhas N, Arnush M, Linkhart TA, Chadwick RB, et al.** Tumor necrosis factor-alpha augments matrix metalloproteinase-9 production in skeletal muscle cells through the activation of transforming growth factor-beta-activated kinase 1 (TAK1)-dependent signaling pathway. *J Biol Chem.* 2007 Dec 30;282(48)35113–24.
216. **Standards T.** Introduction. *Diabetes Care.* 2014 Dec 23;38(Supplement\_1)S1–S2.
217. **Sun K, Kusminski CM, Scherer PE.** Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest.* 2011 Jun;121(6)2094–101.
218. **Sung H-K, Doh K-O, Son JE, Park JG, Bae Y, Choi S, et al.** Adipose vascular endothelial growth factor regulates metabolic homeostasis through angiogenesis. *Cell Metab.* 2013 Jan 8;17(1)61–72.
219. **Tam CS, Tordjman J, Divoux A, Baur L a, Clément K.** Adipose tissue remodeling in children: the link between collagen deposition and age-related adipocyte growth. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012 Apr;97(4)1320–7.
220. **Tanabe K, Bonilla I, Winkles JA, Strittmatter SM.** Fibroblast growth factor-inducible-14 is induced in axotomized neurons and promotes neurite outgrowth. *J Neurosci.* 2003 Oct 22;23(29)9675–86.
221. **Tchernof A, Després J-P.** Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiol Rev.* 2013 Jan;93(1)359–404.
222. **Tests D, Diabetes FOR. 2.** Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care.* 2014 Dec 23;38(Supplement\_1)S8–S16.
223. **Tiller G, Fischer-Posovszky P, Laumen H, Finck A, Skurk T, Keuper M, et al.** Effects of TWEAK (TNF superfamily member 12) on differentiation, metabolism, and secretory function of human primary preadipocytes and adipocytes. *Endocrinology.* 2009 Dec;150(12)5373–83.
224. **Tinahones FJ, Garrido-Sanchez L, Miranda M, García-Almeida JM, Macias-Gonzalez M, Ceperuelo V, et al.** Obesity and insulin resistance-related changes in the expression of lipogenic and lipolytic genes in morbidly obese subjects. *Obes Surg.* 2010 Nov;20(11)1559–67.
225. **Tirnitz-Parker JEE, Viebahn CS, Jakubowski A, Kloplic BRS, Olynyk JK, Yeoh GCT, et al.** Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis is a mitogen for liver progenitor cells. *Hepatology.* 2010 Jul;52(1)291–302.
226. **Tran NL, McDonough WS, Donohue PJ, Winkles J a, Berens TJ, Ross KR, et al.** The human Fn14 receptor gene is up-regulated in migrating glioma

- cells in vitro and overexpressed in advanced glial tumors. *Am J Pathol.* 2003 Apr;162(4)1313–21.
227. **Tran NL, McDonough WS, Savitch B a, Fortin SP, Winkles J a, Symons M, et al.** Increased fibroblast growth factor-inducible 14 expression levels promote glioma cell invasion via Rac1 and nuclear factor-kappaB and correlate with poor patient outcome. *Cancer Res.* 2006 Oct 1;66(19)9535–42.
228. **Trayhurn P.** Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity. *Physiol Rev.* 2013 Jan;93(1)1–21.
229. **Trayhurn P, Beattie JH.** Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc.* 2007 Mar 5;60(03)329–39.
230. **Trayhurn P, Wang B, Wood IS.** Hypoxia in adipose tissue: a basis for the dysregulation of tissue function in obesity? *Br J Nutr.* 2008 Aug;100(2)227–35.
231. **Trayhurn P, Wood IS.** Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr.* 2004 Sep 9;92(03)347–55.
232. **Urbonaviciene G, Martin-Ventura JL, Lindholt JS, Urbonavicius S, Moreno J a, Egido J, et al.** Impact of soluble TWEAK and CD163/TWEAK ratio on long-term cardiovascular mortality in patients with peripheral arterial disease. *Atherosclerosis.* 2011 Dec;219(2)892–9.
233. **Valdés S, García-Torres F, Maldonado-Araque C, Goday A, Calle-Pascual A, Soriguer F, et al.** Prevalence of obesity, diabetes and other cardiovascular risk factors in Andalusia (southern Spain). Comparison with national prevalence data. The Di@bet.es study. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed).* 2014 Jun;67(6)442–8.
234. **Valdivielso JM, Coll B, Martín-Ventura JL, Moreno JA, Egido J, Fernández E, et al.** Soluble TWEAK is associated with atherosclerotic burden in patients with chronic kidney disease. *J Nephrol.* 2013;26(6)1105–13.
235. **Vázquez-Carballo A, Ceperuelo-Mallafre V, Chacón MR, Maymó-Masip E, Lorenzo M, Porrás A, et al.** TWEAK prevents TNF- $\alpha$ -induced insulin resistance through PP2A activation in human adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013 Jul 1;305(1)E101–12.
236. **Vince JE, Chau D, Callus B, Wong WW-L, Hawkins CJ, Schneider P, et al.** TWEAK-FN14 signaling induces lysosomal degradation of a cIAP1-TRAF2 complex to sensitize tumor cells to TNF $\alpha$ . *J Cell Biol.* 2008 Jul 14;182(1)171–84.

237. **Vincenti MP, Coon CI, Brinckerhoff CE.** Nuclear factor kappaB/p50 activates an element in the distal matrix metalloproteinase 1 promoter in interleukin-1beta-stimulated synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 1998 Nov;41(11)1987–94.
238. **Virtue S, Vidal-Puig A.** Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome--an allostatic perspective. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Mar;1801(3)338–49.
239. **Vitali a, Murano I, Zingaretti MC, Frontini a, Ricquier D, Cinti S.** The adipose organ of obesity-prone C57BL/6J mice is composed of mixed white and brown adipocytes. *J Lipid Res.* 2012 Apr;53(4)619–29.
240. **W H O Expert Consultation.** Waist Circumference and Waist-Hip Ratio Report of a WHO Expert Consultation. *W H O.* 2008;(December)8–11.
241. **Wabitsch M, Brenner RE, Melzner I, Braun M, Möller P, Heinze E, et al.** Characterization of a human preadipocyte cell strain with high capacity for adipose differentiation. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2001 Jan;25(1)8–15.
242. **Wajant H.** The TWEAK-Fn14 system as a potential drug target. *Br J Pharmacol.* 2013 Oct;170(4)748–64.
243. **Wajchenberg BL.** Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev.* 2000 Dec;21(6)697–738.
244. **Wang B, Wood IS, Trayhurn P.** Dysregulation of the expression and secretion of inflammation-related adipokines by hypoxia in human adipocytes. *Pflugers Arch.* 2007 Dec;455(3)479–92.
245. **Wang C, Chen L-L, Pan H-F, Leng R-X, Qin W-Z, Ye D-Q.** Expression of human tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol.* 2012 Feb;31(2)335–9.
246. **Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW.** Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2003 Dec;112(12)1796–808.
247. **Wellen KE, Hotamisligil GS.** Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest.* 2005 May;115(5)1111–9.
248. **Wellen KE, Thompson CB.** Cellular metabolic stress: considering how cells respond to nutrient excess. *Mol Cell.* 2010 Oct 22;40(2)323–32.
249. **Whitsett TG, Cheng E, Inge L, Asrani K, Jameson NM, Hostetter G, et al.** Elevated expression of Fn14 in non-small cell lung cancer correlates with

- activated EGFR and promotes tumor cell migration and invasion. *Am J Pathol.* 2012 Jul;181(1)111–20.
250. **Wicovsky a, Salzman S, Roos C, Ehrenschwender M, Rosenthal T, Siegmund D, et al.** TNF-like weak inducer of apoptosis inhibits proinflammatory TNF receptor-1 signaling. *Cell Death Differ.* 2009 Nov;16(11)1445–59.
251. **Wiley SR, Cassiano L, Lofton T, Davis-Smith T, Winkles J a, Lindner V, et al.** A novel TNF receptor family member binds TWEAK and is implicated in angiogenesis. *Immunity.* 2001 Nov;15(5)837–46.
252. **Wiley SR, Winkles J a.** TWEAK, a member of the TNF superfamily, is a multifunctional cytokine that binds the TweakR/Fn14 receptor. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003 Jun;14(3-4)241–9.
253. **Willis AL, Tran NL, Chatigny JM, Charlton N, Vu H, Brown S a N, et al.** The fibroblast growth factor-inducible 14 receptor is highly expressed in HER2-positive breast tumors and regulates breast cancer cell invasive capacity. *Mol Cancer Res.* 2008 May;6(5)725–34.
254. **Wilson C a, Browning JL.** Death of HT29 adenocarcinoma cells induced by TNF family receptor activation is caspase-independent and displays features of both apoptosis and necrosis. *Cell Death Differ.* 2002 Dec;9(12)1321–33.
255. **Winkles J a.** The TWEAK-Fn14 cytokine-receptor axis: discovery, biology and therapeutic targeting. *Nat Rev Drug Discov.* 2008 May;7(5)411–25.
256. **Wood IS, Wang B, Lorente-Cebrián S, Trayhurn P.** Hypoxia increases expression of selective facilitative glucose transporters (GLUT) and 2-deoxy-D-glucose uptake in human adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Sep 21;361(2)468–73.
257. **Wu J, Boström P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang A-H, et al.** Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell.* 2012 Jul 20;150(2)366–76.
258. **Xia L, Shen H, Xiao W, Lu J.** Increased serum TWEAK levels in Psoriatic arthritis: relationship with disease activity and matrix metalloproteinase-3 serum levels. *Cytokine.* 2011 Mar;53(3)289–91.
259. **Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, et al.** Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest.* 2003 Dec;112(12)1821–30.



260. **Xue B, Rim J-S, Hogan JC, Coulter A a, Koza R a, Kozak LP.** Genetic variability affects the development of brown adipocytes in white fat but not in interscapular brown fat. *J Lipid Res.* 2007 Jan;48(1)41–51.
261. **Yamana J, Morand EF, Manabu T, Sunahori K, Takasugi K, Makino H, et al.** Inhibition of TNF-induced IL-6 by the TWEAK-Fn14 interaction in rheumatoid arthritis fibroblast like synoviocytes. *Cell Immunol.* 2012 Jan;272(2)293–8.
262. **Yanaba K, Yoshizaki A, Muroi E, Hara T, Ogawa F, Usui A, et al.** Elevated circulating TWEAK levels in systemic sclerosis: association with lower frequency of pulmonary fibrosis. *J Rheumatol.* 2009 Aug;36(8)1657–62.
263. **Yang L, Calay ES, Fan J, Arduini A, Kunz RC, Gygi SP, et al.** METABOLISM. S-Nitrosylation links obesity-associated inflammation to endoplasmic reticulum dysfunction. *Science.* 2015 Jul 31;349(6247)500–6.
264. **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.* 2007 Oct;293(4)E1118–28.
265. **Yepes M, Brown S a N, Moore EG, Smith EP, Lawrence D a, Winkles J a.** A soluble Fn14-Fc decoy receptor reduces infarct volume in a murine model of cerebral ischemia. *Am J Pathol.* 2005 Feb;166(2)511–20.
266. **Yilmaz MI, Carrero JJ, Martín-Ventura JL, Sonmez A, Saglam M, Celik T, et al.** Combined therapy with renin-angiotensin system and calcium channel blockers in type 2 diabetic hypertensive patients with proteinuria: effects on soluble TWEAK, PTX3, and flow-mediated dilation. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2010 Jul;5(7)1174–81.
267. **Yilmaz MI, Carrero JJ, Ortiz A, Martín-Ventura JL, Sonmez A, Saglam M, et al.** Soluble TWEAK plasma levels as a novel biomarker of endothelial function in patients with chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009 Nov;4(11)1716–23.
268. **Yilmaz MI, Sonmez A, Ortiz A, Saglam M, Kilic S, Eyiletten T, et al.** Soluble TWEAK and PTX3 in nondialysis CKD patients: impact on endothelial dysfunction and cardiovascular outcomes. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2011 Apr;6(4)785–92.
269. **Yin J, Gao Z, He Q, Zhou D, Guo Z, Ye J.** Role of hypoxia in obesity-induced disorders of glucose and lipid metabolism in adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009 Feb;296(2)E333–42.

270. **Zanni M V, Burdo TH, Makimura H, Williams KC, Grinspoon SK.** Relationship between monocyte/macrophage activation marker soluble CD163 and insulin resistance in obese and normal-weight subjects. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2012 Sep;77(3)385–90.
271. **Zeyda M, Farmer D, Todoric J, Aszmann O, Speiser M, Györi G, et al.** Human adipose tissue macrophages are of an anti-inflammatory phenotype but capable of excessive pro-inflammatory mediator production. *Int J Obes (Lond)*. 2007 Sep;31(9)1420–8.
272. **Zeyda M, Stulnig TM.** Adipose tissue macrophages. *Immunol Lett*. 2007 Oct 15;112(2)61–7.
273. **Zhang QX, Magovern CJ, Mack CA, Budenbender KT, Ko W, Rosengart TK.** Vascular endothelial growth factor is the major angiogenic factor in omentum: mechanism of the omentum-mediated angiogenesis. *J Surg Res*. 1997 Feb 1;67(2)147–54.
274. **Zimmermann M, Koreck A, Meyer N, Basinski T, Meiler F, Simone B, et al.** TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) and TNF- $\alpha$  cooperate in the induction of keratinocyte apoptosis. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Jan;127(1)200–7, 207.e1–10.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA CITOCINA TWEAK Y DE SU RECEPTOR Fn14 EN EL CONTEXTO DE LA OBESIDAD.

Elsa Maymó Masip

Dipòsit Legal: T 322-2016

## ANEXO

**Artículo complementario a la línea/estudios que forman parte de la tesis.**

*Serum sTWEAK concentrations and risk of developing type 2 diabetes in a high cardiovascular risk population: a nested case-control study.*

Díaz-López A, Chacón MR, Bulló M, **Maymó-Masip E**, Martínez-González MA, Estruch R, Vendrell J, Basora J, Díez-Espino J, Covas MI, Salas-Salvadó J. J Clin Endocrinol Metab. 2013 Aug;98(8):3482-90. doi: 10.1210/jc.2013-1848. Epub 2013 Jun 12.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA CITOCINA TWEAK Y DE SU RECEPTOR Fn14 EN EL CONTEXTO DE LA OBESIDAD.

Elsa Maymó Masip

Dipòsit Legal: T 322-2016

## Serum sTWEAK Concentrations and Risk of Developing Type 2 Diabetes in a High Cardiovascular Risk Population: A Nested Case-Control Study

Andrés Díaz-López, Matilde R. Chacón, Mònica Bulló, Elsa Maymó-Masip, Miguel A. Martínez-González, Ramón Estruch, Joan Vendrell, Josep Basora, Javier Díez-Espino, María-Isabel Covas, and Jordi Salas-Salvadó

Human Nutrition Unit (A.D.-L., M.B., J.B., J.S.-S.), Faculty of Medicine and Health Sciences, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, 43201 Reus, Tarragona, Spain; CIBERobn Physiopathology of Obesity and Nutrition (A.D.-L., M.B., M.A.M.-G., R.E., J.B., M.-I.C., J.S.-S.), Institute of Health Carlos III, 28029 Madrid, Spain; The Biomedical Research Centres Network for Diabetes and Associated Metabolic Disorders (CIBERDEM) (E.M.-M., M.R.C., J.V.), University Hospital of Tarragona Joan XXIII, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, 43007 Tarragona, Spain; Department of Preventive Medicine and Public Health (M.A.M.-G.), University of Navarra, 31008 Pamplona, Spain; Department of Internal Medicine (R.E.), Hospital Clínic, Institut d'Investigació Biomèdica August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, 08036 Barcelona, Spain; Primary Health Care Centre of Tafalla (J.D.-E.), 31300 Tafalla, Spain; and Lipids and Cardiovascular Epidemiology Research Unit (M.-I.C.), Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM), 08003 Barcelona, Spain

**Context and Objective:** Because serum concentrations of soluble forms of TNF-like weak inducer of apoptosis (sTWEAK) and scavenger receptor CD163 (sCD163) have been associated with insulin resistance and type 2 diabetes mellitus (T2D), we tested the associations of sTWEAK and sCD163 with the future development of T2D in elderly subjects at high cardiovascular risk.

**Design, Setting, and Participants:** A prospective, matched case-control study of 153 cases of newly diagnosed diabetic subjects and 306 individually matched controls who did not develop diabetes during a mean 5-year follow-up was conducted using data from the PREDIMED study. Conditional logistic regression was used to estimate the matched odds ratio (OR) for incident T2D according to categories of baseline sTWEAK and sCD163 concentrations measured by ELISA.

**Results:** Baseline sTWEAK concentrations were lower in cases than controls. There were no case-control differences in sCD163 concentrations. In the conditional logistic model that took into account the matching factors, the ORs for T2D incidence in the highest vs the lowest quartile of sTWEAK and the sCD163/sTWEAK ratio were 0.49 (95% confidence interval [CI], 0.31–0.76; *P* for trend <.01) and 1.67 (95% CI, 1.06–2.63; *P* for trend = .05), respectively. Further adjustment for potential lifestyle confounding factors had little impact on these estimates, whereas adjustment for metabolic syndrome components and fasting insulin levels attenuated the magnitude of associations and only the sTWEAK remained statistically significant (OR = 0.63; 95% CI, 0.40–0.98; *P* for trend = .05).

**Conclusion:** These findings indicate that in a population at high cardiovascular risk, reduced circulating levels of sTWEAK are associated with an increased risk of diabetes incidence. (*J Clin Endocrinol Metab* 98: 3482–3490, 2013)

**T**ype 2 diabetes (T2D) is a growing public health issue that has a major effect on morbidity and premature mortality worldwide (1, 2). Obesity, a major risk factor for diabetes (3), induces chronic low-grade inflammation in adipose tissue, characterized by an infiltration of activated macrophages, increased expression of cytokines, and a greater predisposition to obesity-related insulin resistance (4), a necessary step in the pathogenesis of diabetes (5). Concordantly, many cytokines have been implicated in multiple pathways modulating the inflammation associated with glucose metabolism, insulin sensitivity, and T2D (6, 7). One of these pathways could be mediated by the TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK), a molecule of the TNF superfamily of cytokines mainly produced by macrophages. TWEAK is synthesized as a type II transmembrane glycoprotein and subsequently released into the circulation as a soluble bioactive form (sTWEAK) (8). In recent years, TWEAK has emerged as a new player in inflammatory processes (9). The binding of TWEAK to its receptor, fibroblast growth factor-inducible 14 (Fn14), is responsible for a variety of biological activities, including stimulation of cell growth, angiogenesis, induction of proinflammatory cytokines, and apoptosis (10).

Cross-sectional studies have shown that serum sTWEAK concentrations are decreased in type 1 diabetes (T1D) and T2D patients (11, 12). Furthermore, an inverse association between sTWEAK concentrations and both fasting glucose and homeostasis model of assessment (HOMA) for insulin resistance (HOMA-IR) have been cross-sectionally reported in T2D patients on chronic hemodialysis (12). Similarly, sTWEAK concentrations were negatively associated with fasting glucose levels in asymptomatic subjects (13).

Another TWEAK binding membrane protein, the scavenger receptor CD163, has been identified. CD163 is expressed as a membrane-bound protein in macrophages and monocytes, which is highly expressed in human adipose tissue. It circulates in blood as a soluble form (sCD163) generated by a proteolytic cleavage of the membrane CD163 (14, 15). However, the functional role of sCD163 remains to be fully characterized. Surprisingly, cross-sectional studies have shown that serum sCD163 concentrations are increased in obese subjects and are strongly positively associated with HOMA-IR in both normal-weight and overweight individuals with T2D or impaired glucose tolerance (13–18). Furthermore, in a recent prospective study with 18-year follow-up, it has been shown that increased concentrations of serum sCD163 are a risk factor for developing T2D (19).

Altogether, these data suggest that soluble forms of TWEAK and CD163 could play an intermediary role in

the pathogenesis of T2D by directly inducing insulin resistance or through inflammatory mechanisms.

To our knowledge, the relationship between the concentrations of both biomarkers and the development of T2D has yet to be evaluated. Therefore, to address the associations of sTWEAK and sCD163 with the future development of diabetes, we tested the hypothesis that decreased concentrations of sTWEAK and increased concentrations of sCD163 are related to a higher risk of T2D. For this purpose, we identified new cases of diabetes occurring during the follow-up of a cohort of nondiabetic individuals from the PREvención con Dieta MEDiterránea (PREDIMED) study and measured baseline serum sTWEAK and sCD163 concentrations in these cases and matched controls.

## Subjects and Methods

### Study design and population

The PREDIMED study is a multicenter, randomized, parallel group primary prevention trial conducted in Spain to assess the effects of the Mediterranean diet (MedDiet) on cardiovascular disease (CVD). The protocol, design, objectives, and methods of the PREDIMED trial (<http://www.controlled-trials.com/ISRCTN35739639>) have been reported in detail elsewhere (20, 21), and are available at <http://www.predimed.org> and [www.predimed.es](http://www.predimed.es). Briefly, recruitment took place between 2003 and 2009, and 7447 asymptomatic individuals at high risk for coronary heart disease (CHD) complied with inclusion criteria and were randomly assigned in a 1:1:1 ratio to 1 of 3 nutrition intervention groups: 2 MedDiet groups (supplemented with virgin olive oil or nuts) or a control low-fat diet group consisting of advice to reduce intake of all types of fat. Randomization was performed centrally by means of a computer-generated random-number sequence. The Institutional Review Boards of the recruitment centers approved the study protocol, and participants gave their written informed consent.

The present report describes a nested case-control study within the longitudinal study, to assess the associations between baseline serum concentrations of sTWEAK and sCD163 and the future development of T2D.

For the nested case-control study, we used data from 459 individuals of the total 1378 Caucasian nondiabetic individuals recruited from 3 Spanish centers of the PREDIMED study (Reus-Tarragona, Pamplona, and Barcelona Clinic). Subjects were community-dwelling men aged 55–80 years and women aged 60–80 years without prior CVD at baseline but with at least 3 of the following cardiovascular risk factors: smoking, hypertension, dyslipidemia, overweight/obesity, or family history of premature CHD. The exclusion criteria for the PREDIMED study were any severe chronic illness, alcohol or drug addiction, and history of food allergy to olive oil or nuts. All participants with baseline-prevalent diabetes were excluded from the present analysis.

Of the 1378 individuals recruited, we selected all the individuals who developed T2D during follow-up ( $n = 153$ ). The median follow-up was 5.9 years (minimum, 1.2 mo; maximum,

8.2 y). For each subject who developed diabetes, 2 controls were selected at random among those who had not developed diabetes during the follow-up ( $n = 306$ ). Controls were matched for dietary intervention group (MedDiet+virgin olive oil, MedDiet+nuts, or control group), age ( $\leq 67$  vs  $>67$  y), sex, and body mass index (BMI) ( $\leq 27$  vs  $>27$  kg/m<sup>2</sup>).

### Ascertainment of incident diabetes

The primary outcome was new-onset diabetes, diagnosed according to American Diabetes Association criteria (22): namely, fasting plasma glucose  $\geq 126$  mg/dL (7 mmol/L) or 2-hour plasma glucose  $\geq 200$  mg/dL (11.1 mmol/L) after a 75-g oral glucose tolerance test measured yearly. A second test using the same criteria as above was required for confirmation. Cases were ascertained by the PREDIMED Clinical Event Committee, whose members were blinded to the intervention and to the assessed biomarkers.

### Measurements

At baseline and each annual visit, all participants completed: 1) a general questionnaire about education, lifestyle, comorbidities, and medication use; 2) a validated 137-item food frequency questionnaire (20); 3) a validated physical activity questionnaire (23); and 4) a validated 14-point questionnaire to assess adherence to the MedDiet (24). In addition, anthropometric variables and blood pressure measured in triplicate using a validated semiautomatic oscillometer (Omron HEM-705CP; Omron Corp., Hoofddorp, The Netherlands) were determined (25).

### Biochemical determinations

Blood samples were collected after an overnight fast. The aliquots of serum and EDTA plasma were immediately processed, coded, and shipped to a central laboratory in a portable cooler ( $-4^{\circ}\text{C}$ ), and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis. The time between blood sampling and freezing was less than 1 hour. Plasma levels of fasting glucose and serum levels of total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol, and triglycerides were measured by standard enzymatic methods. Low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol concentrations were calculated using Friedewald's equation. Plasma insulin concentrations were measured by ELISA (EZHI-14K; Millipore, St Charles, Missouri) with intra- and interassay coefficients of variation of 5.9 and 10.3%, respectively. Insulin resistance was estimated by the HOMA method:  $\text{HOMA-IR} = [\text{fasting insulin } (\mu\text{IU/mL}) \times \text{fasting glucose } (\text{mmol/L})] / 22.5$ .

Serum concentrations of sTWEAK and sCD163 were determined in duplicate by ELISA using the commercially available human TWEAK/TNFSF12 kit DY1090 and human CD163 kit DY1607 (R&D Systems Europe, Abingdon, Oxon, United Kingdom), respectively. The intra- and interassay coefficients of variation were 2.5 and 7.0% for sTWEAK and 2.4 and 6.4% for sCD163, respectively.

### Statistical analysis

The baseline characteristics of participants were described using mean  $\pm$  SD values or median and interquartile range (IQR) for continuous variables, and numbers and percentage for categorical variables. The normality of variables was tested using the Kolmogorov-Smirnov test. Fasting glucose, insulin, sTWEAK, sCD163, and the sCD163/sTWEAK ratio were log-

transformed to approximately normalize their distributions before the analyses. Student's  $t$  test for continuous variables and  $\chi^2$  test for categorical variables were used to assess differences according to baseline characteristics between participants who developed diabetes or not. BMI, age- and sex-adjusted partial correlation coefficients were used to assess the relationship between biomarkers measured at baseline and components of the insulin resistance syndrome.

To assess the risk of diabetes for each of the serum concentration categories of the biomarkers, participants were categorized according to their quartiles of baseline sex-adjusted sTWEAK and sCD163 concentrations (or the sCD163/sTWEAK ratio). We used conditional logistic regression models to estimate the matched odds ratios (ORs) and the 95% confidence interval (CI) for incident diabetes for the 3 upper quartiles using the lowest quartile as the reference category.

An unadjusted model and 2 other adjusted models were fitted. Model 1 was adjusted for known diabetes risk factors: family history of diabetes (yes/no), educational level, alcohol consumption ( $\geq 3$  standard drink units for men or  $\geq 1.5$  for women or less than these amounts), smoking (current/not current), leisure-time physical activity (sedentary,  $\leq 200$  metabolic equivalents [METs]-min/d; vs active,  $>200$  METs-min/d), and the PREDIMED 14-item MedDiet score (0-14). Model 2 was additionally adjusted for the metabolic syndrome (MetS) components: waist circumference  $>102$  cm in men/ $>88$  cm in women (yes/no); serum triglycerides  $\geq 150$  mg/dL (1.6 mmol/L) (yes/no); HDL-cholesterol  $<40$  mg/dL (1 mmol/L) in men/ $<50$  mg/dL (1.2 mmol/L) in women (yes/no); high blood pressure ( $\geq 130/85$  mm Hg) or treatment with antihypertensive medication (yes/no); fasting plasma glucose level  $\geq 100$  mg/dL (5.5 mmol/L) (yes/no); and fasting insulin levels (log<sub>e</sub>-transformed continuous variable). Linear-trend tests were conducted across categories by assigning the medians to each category and treating it as a continuous variable. All statistical tests were 2-tailed, and the significance level was set at  $P \leq .05$ . Analyses were performed using SPSS software version 19.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois).

### Results

Of the 459 participants, 7 were excluded because no blood samples were available to determine sTWEAK or sCD163 concentrations. Thus, analyses were carried out in a sample of 452 individuals.

Table 1 shows the selected baseline characteristics and biomarker concentrations of those participants who developed incident T2D (cases,  $n = 148$ ) and those who remained free of diabetes (matched controls,  $n = 304$ ) during the follow-up. As expected, the percentage of men and individuals in each of the intervention groups, average age, and BMI were similar between both groups. Individuals who developed diabetes were more likely to have a family history of diabetes (36.0 vs 24.5%), had higher baseline mean systolic blood pressure and triglyceride concentrations, and had lower baseline HDL-cholesterol levels than their matched control individuals. Cases had higher baseline levels of fasting glucose, insulin, and



**Table 1.** Baseline Characteristics of Participants

Baseline Variable	Incident Diabetics (cases)	Matched Controls <sup>a</sup>	P Value <sup>b</sup>
n	148	304	
Age, y	66.3 ± 5.8	66.3 ± 6.0	.96
MedDiet+VOO/MedDiet+Nuts/control intervention groups, n	49/43/56	100/89/115	1.00
Men	72 (47)	144 (47)	1.00
Body weight, kg	78.49 ± 11.25	76.81 ± 10.88	.12
BMI, kg/m <sup>2</sup>	30.20 ± 3.18	29.79 ± 3.00	.18
Overweight/obesity (BMI ≥ 25 kg/m <sup>2</sup> )	148 (97)	293 (96)	.61
Smoking habits			.20
Current smoker	40 (26)	64 (21)	
Non-smoker	113 (74)	242 (79)	
Physical activity, METs-min/d	276.9 ± 229.0	267.4 ± 238.9	.68
Educational level			.88
Primary education or illiterate	106 (69)	214 (70)	
Secondary or higher education	47 (31)	92 (30)	
Family history of diabetes	55 (36.0)	75 (24.5)	.01
Family history of premature CHD	33 (21.6)	46 (15.0)	.08
Medication use			
Statins	67 (43.8)	122 (39.9)	.42
Fibrates	2 (1.3)	8 (2.6)	.51
Antihypertensive drugs	118 (77.1)	234 (76.5)	.91
Diastolic blood pressure, mm Hg	87.50 ± 10.97	85.99 ± 10.23	.14
Systolic blood pressure, mm Hg	154.89 ± 20.93	151.20 ± 19.80	.06
Triglyceride, mg/dL	156.2 ± 113.2	136.4 ± 70.3	.02
Total cholesterol, mg/dL	219.9 ± 42.1	224.6 ± 35.2	.21
LDL-cholesterol, mg/dL	136.1 ± 33.0	140.7 ± 32.1	.15
HDL-cholesterol, mg/dL	53.21 ± 12.49	56.27 ± 14.15	.02
Fasting glucose, mg/dL <sup>c</sup>	110.0 (100.0, 123.0)	93.0 (87.0, 99.0)	<.001
Fasting insulin, μU/mL <sup>c</sup>	5.32 (3.44, 7.34)	4.32 (3.08, 6.69)	.021
HOMA-IR	1.70 ± 1.08	1.23 ± 0.79	<.001
sTWEAK, pg/mL <sup>c</sup>	538.7 (303.9, 745.4)	591.5 (419.5, 837.9)	.04
sCD163, ng/mL <sup>c</sup>	225.9 (171.4, 308.0)	223.3 (166.9, 305.8)	.99
sCD163/sTWEAK ratio <sup>c</sup>	0.43 (0.27, 0.74)	0.38 (0.22, 0.61)	.08
MedDiet score (0 to 14)	8.56 ± 1.76	8.64 ± 1.88	.64

Abbreviations: MedDiet+VOO, MedDiet supplemented with virgin olive oil; MedDiet+nuts, MedDiet supplemented with nuts. Data are expressed as mean ± SD or number (%), unless otherwise specified. SI conversion factors: triglycerides, mg/dL × 0.01129 = mmol/L; cholesterol, HDL-cholesterol, and LDL-cholesterol, mg/dL × 0.02586 = mmol/L; glucose, mg/dL × 0.0556 = mmol/L; insulin, μU/mL × 6.945 = pmol/L.

<sup>a</sup> Matched for dietary intervention group (MedDiet+VOO, MedDiet+Nuts, or control group), age (≤67 vs >67 y), sex, and BMI (≤27 vs >27 kg/m<sup>2</sup>).

<sup>b</sup> P value for comparisons between 2 groups was tested by  $\chi^2$  test for categorical variables or Student's *t* test for continuous variables.

<sup>c</sup> Values expressed as median (IQR).

HOMA-IR. Compared to matched controls, incident cases had lower median serum sTWEAK concentrations (538.7 vs 591.5 pg/mL; *P* = .04) and a nonsignificantly higher sCD163/sTWEAK ratio (0.43 vs 0.38; *P* = .08), whereas median levels of sCD163 concentrations were similar in cases and controls.

Serum concentrations of sTWEAK and sCD163 and their sCD163/sTWEAK ratio according to the baseline characteristics of the case-control sample are summarized in Table 2. The median serum concentrations of sTWEAK were significantly lower in men than in women, in current smokers vs nonsmokers, in individuals that had impaired fasting glucose (≥110 mg/dL [6 mmol/L]), and in individuals with MetS (*P* values < .05, all). There were no significant differences between serum sTWEAK concentrations and other selected characteristics. Similarly, no

significant differences were observed in serum sCD163 concentrations in the different subgroups. The sCD163/sTWEAK ratio was significantly higher in men vs women, in individuals that had impaired fasting glucose, and in individuals with MetS (*P* values < .05, all). We calculated BMI, age- and sex-adjusted partial correlation coefficients between baseline serum concentrations of sTWEAK and sCD163, or the sCD163/sTWEAK ratio and components of the insulin resistance syndrome (Table 3). No relationship between sTWEAK and sCD163 was found (data not shown). However, statistically significant negative relationships were found between sTWEAK and HOMA-IR (*r* = -0.17, *P* < .05 in cases; *r* = -0.12, *P* < .05 in controls). In contrast, the sCD163/sTWEAK ratio was also positively related to HOMA-IR (*r* = 0.23, *P* < .01 in cases; *r* = 0.16, *P* < .01 in controls).

**Table 2.** Serum Concentrations of sTWEAK and sCD163 and sCD163/sTWEAK Ratio According to Baseline Characteristics of Participants Included in the Study

Baseline Variable	sTWEAK, pg/mL	P Value	sCD163, ng/mL	P Value	sCD163/sTWEAK Ratio	P Value
Age		.49		.76		.44
≤67 y (n = 267)	549.4 (391.6, 788.5)		224.8 (174.1, 303.2)		0.39 (0.25, 0.67)	
>67 y (n = 185)	586.5 (388.4, 840.7)		221.8 (164.3, 313.5)		0.38 (0.23, 0.66)	
Sex		.01		.78		.04
Men (n = 214)	537.7 (375.5, 684.9)		227.7 (166.8, 303.7)		0.44 (0.27, 0.69)	
Women (n = 238)	631.9 (411.3, 951.4)		221.0 (171.1, 313.5)		0.36 (0.21, 0.58)	
Obesity (BMI > 30 kg/m <sup>2</sup> )		.12		.65		.11
With (n = 208)	536.3 (368.5, 795.2)		226.7 (169.7, 307.6)		0.40 (0.25, 0.70)	
Without (n = 244)	594.8 (421.3, 820.5)		223.0 (167.5, 305.7)		0.38 (0.23, 0.61)	
Current smoker		.04		.26		.29
Yes (n = 104)	530.0 (373.3, 632.0)		224.9 (165.0, 289.5)		0.41 (0.29, 0.59)	
No (n = 348)	599.5 (401.7, 850.9)		224.5 (171.1, 311.9)		0.39 (0.22, 0.68)	
Physical activity (>200 METs-min/d)		.51		.58		.37
Active (n = 221)	592.5 (394.0, 844.5)		214.4 (168.9, 292.3)		0.36 (0.22, 0.62)	
Sedentary (n = 231)	545.6 (383.2, 789.4)		234.2 (168.5, 308.9)		0.42 (0.26, 0.68)	
Hypertension		.79		.78		.94
With (n = 437)	563.3 (388.4, 815.1)		226.5 (169.1, 308.1)		0.39 (0.25, 0.66)	
Without (n = 14)	616.9 (537.7, 706.4)		213.1 (164.7, 277.4)		0.38 (0.26, 0.54)	
Family history of diabetes		.69		.71		.90
With (n = 128)	573.7 (366.9, 908.6)		232.3 (171.4, 305.8)		0.39 (0.21, 0.74)	
Without (n = 324)	562.7 (397.9, 787.6)		217.6 (168.6, 307.2)		0.39 (0.25, 0.65)	
Fasting glucose		<.01		.21		<.01
>110 mg/dL (n = 97)	485.7 (289.9, 726.3)		242.3 (169.1, 310.0)		0.48 (0.29, 0.85)	
≤110 mg/dL (n = 349)	581.6 (417.2, 811.3)		219.3 (168.3, 304.2)		0.37 (0.22, 0.58)	
MetS		.02		.08		<.01
With (n = 232)	541.8 (366.1, 749.9)		240.1 (171.4, 317.2)		0.42 (0.26, 0.75)	
Without (n = 220)	598.2 (426.8, 864.8)		215.8 (165.1, 291.0)		0.36 (0.21, 0.54)	

Data are expressed as median (IQR). *P* value for comparisons between the different subgroups was tested by Student's *t* test.

Table 4 shows the results of the conditional logistic regression models, in which we assessed the associations of baseline serum concentrations of the biomarkers with incident T2D. In the crude analyses conditioned on matching for dietary intervention group, age, sex, and BMI, there was a statistically significant association between increased sTWEAK concentrations and a decreased risk of incident T2D in individuals in the top quartile vs those in the lowest quartile (OR, 0.49; 95% CI, 0.31–0.76; *P* for linear trend < .01). This association was similar after fur-

ther adjustment for family history of diabetes and different lifestyle risk factors (model 1). Additional control for MetS components and insulin concentrations considerably attenuated but did not eliminate this association, although the linear trend across the quartiles of sTWEAK concentrations was borderline significant (OR, 0.63; 95% CI, 0.40–0.98; *P* for linear trend = .05) (model 2). No significant associations were observed between sCD163 concentrations and incident diabetes in either of the adjusted models tested. As expected, like the results obtained

**Table 3.** BMI-, Age-, and Gender-Adjusted Partial Correlation Coefficients Between Serum Concentrations of sTWEAK and sCD163 or the sCD163/sTWEAK Ratio and Components of the Insulin Resistance Syndrome

	All (n = 452)			Incident Diabetics (cases) (n = 148)			Matched controls (n = 304) <sup>#</sup>		
	Glucose	Insulin	HOMA-IR	Glucose	Insulin	HOMA-IR	Glucose	Insulin	HOMA-IR
sTWEAK, pg/mL	−0.13 <sup>b</sup>	−0.15 <sup>b</sup>	−0.16 <sup>c</sup>	−0.18 <sup>a</sup>	−0.15 <sup>a</sup>	−0.17 <sup>a</sup>	−0.04	−0.14 <sup>b</sup>	−0.12 <sup>a</sup>
sCD163, ng/mL	0.01	0.09 <sup>a</sup>	0.11 <sup>a</sup>	−0.04	0.14	0.14	0.06	0.07	0.09
sCD163/sTWEAK ratio	0.12 <sup>b</sup>	0.18 <sup>c</sup>	0.20 <sup>c</sup>	0.12	0.20 <sup>b</sup>	0.23 <sup>b</sup>	0.07	0.16 <sup>b</sup>	0.16 <sup>b</sup>

Data are correlation coefficients.

<sup>#</sup> Matched for dietary intervention group (MedDiet supplemented with virgin olive oil, MedDiet supplemented with nuts, or control group), age (≤67 vs >67 yr), sex, and BMI (≤27 vs >27 kg/m<sup>2</sup>).

<sup>a</sup> *P* < .05; <sup>b</sup> *P* < .01; <sup>c</sup> *P* < .001.

**Table 4.** Crude and Adjusted Risk of T2D According to Sex-Adjusted Quartiles of Serum Concentrations of sTWEAK and sCD163 or the sCD163/sTWEAK Ratio

	Quartiles (Q) of Biomarkers				P for Linear Trend
	Q1	Q2	Q3	Q4	
n	112	114	114	112	
sTWEAK, median (IQR), pg/mL	275.4 (227.4, 327.9)	489.7 (440.4, 536.4)	668.5 (598.8, 760.7)	1276.2 (910.1, 1996.4)	
Crude (matched) <sup>a</sup> model	1 (Ref.)	0.40 (0.25–0.63)	0.46 (0.29–0.71)	0.49 (0.31–0.76)	<.01
Model 1	1 (Ref.)	0.43 (0.27–0.69)	0.46 (0.30–0.73)	0.52 (0.33–0.81)	<.01
Model 2	1 (Ref.)	0.45 (0.29–0.72)	0.58 (0.37–0.91)	0.63 (0.40–0.98)	.05
sCD163, median (IQR), ng/mL	134.0 (108.5, 155.3)	195.0 (184.2, 207.7)	258.8 (245.1, 284.7)	401.6 (334.1, 494.8)	
Crude (matched) <sup>a</sup> model	1 (Ref.)	1.01 (0.69–1.76)	1.04 (0.66–1.65)	1.07 (0.66–1.72)	.82
Model 1	1 (Ref.)	1.15 (0.72–1.83)	0.94 (0.58–1.49)	1.06 (0.64–1.73)	.99
Model 2	1 (Ref.)	1.15 (0.72–1.84)	0.93 (0.58–1.50)	1.07 (0.65–1.75)	.99
sCD163/sTWEAK ratio, median (IQR)	0.16 (0.10, 0.20)	0.31 (0.28, 0.35)	0.48 (0.43, 0.56)	0.98 (0.77, 1.28)	
Crude (matched) <sup>a</sup> model	1 (Ref.)	1.26 (0.79–2.02)	0.94 (0.57–1.53)	1.67 (1.06–2.63)	.05
Model 1	1 (Ref.)	1.21 (0.75–1.95)	0.92 (0.56–1.52)	1.65 (1.04–2.61)	.05
Model 2	1 (Ref.)	1.25 (0.76–2.05)	0.98 (0.58–1.65)	1.52 (0.94–2.46)	.12

Results are expressed as matched ORs (95% CI), unless otherwise specified.

<sup>a</sup> Matched for dietary intervention group (MedDiet supplemented with olive oil, MedDiet supplemented with nuts or control group), age ( $\leq 67$  vs  $> 67$  yr), sex, and BMI ( $\leq 27$  vs  $> 27$  kg/m<sup>2</sup>).

Model 1: Adjusted for family history of diabetes (yes/no); educational level (primary education/illiterate vs secondary/higher education); alcohol consumption ( $\geq 3$  standard drink units for men,  $\geq 1.5$  for women, or less than these amounts); smoking (current/not current); physical activity (sedentary vs active); and MedDiet score (0–14).

Model 2: Further adjusted for MetS components—waist circumference  $> 102$  cm in men/ $> 88$  cm in women (yes/no); serum triglyceride  $\geq 150$  mg/dL (yes/no); HDL-cholesterol  $< 40$  mg/dL in men/ $< 50$  mg/dL in women (yes/no); high blood pressure ( $\geq 130/85$  mm Hg) or medication use (yes/no); fasting plasma glucose level  $\geq 100$  mg/dL (yes/no); and fasting insulin levels ( $\log_e$ -transformed continuous variable).

with sTWEAK concentrations, the sCD163/sTWEAK ratio was borderline significantly associated with diabetes incidence, in both crude and adjusted model 1 (*P* for linear trend = .05, both). This association disappeared after adjustment for other MetS components and insulin concentrations as confounders.

## Discussion

In this large prospective nested case-control study conducted in participants in the PREDIMED study, we used fully adjusted analyses to show that those individuals in the highest baseline quartile of sTWEAK concentrations had a 37% lower risk of eventually developing T2D than those in the lowest quartile. Thus, decreased serum levels of sTWEAK are significantly and independently associated with an increased risk of T2D. These findings highlight a possible role of sTWEAK on the pathogenesis of T2D.

As far as we know, there is no prospective epidemiological evidence to suggest that serum sTWEAK concentrations are linked to diabetes incidence. However, some cross-sectional studies point to a link between sTWEAK

concentrations and diabetes (11, 12). Thus, in a recently published case-control study, T1D patients showed decreased concentrations of serum sTWEAK compared with controls (11). In this context, Kralisch et al (12) determined sTWEAK serum concentrations in 60 chronic hemodialysis patients (32 had T2D) and 60 controls (30 had T2D). In that study, mean serum sTWEAK concentrations were significantly decreased in those individuals with T2D or hemodialysis and were lowest in subjects with both conditions (12). These data are in agreement with the results of our study, which indicate that decreased serum concentrations of sTWEAK could be viewed as a surrogate biomarker for T2D.

In accordance with previous reports on glucose metabolism (12, 13, 26), in our study serum sTWEAK concentrations were inversely associated with HOMA-IR levels, independently of the case-control status. Elucidating the mechanisms responsible for improvement of insulin sensitivity might enhance the understanding of the pathophysiology of T2D, being a prerequisite for the development of preventive strategies. Thus, taking into account these data altogether, the sTWEAK may be considered as

an indicative biomarker for obesity-associated insulin resistance, which can be measured easily in blood samples and may prove to be of clinical value for the early identification of individuals at risk of diabetes.

There is no consensus as to whether there are sex differences in the peripheral blood levels of sTWEAK. The results of our study agree with those of previous reports, which show that females had higher concentrations of sTWEAK than males (12, 27) and, therefore, that there may be a sex dimorphism. Smokers in our study showed decreased peripheral concentrations of sTWEAK. The negative association between smoking and sTWEAK has also been recently observed by our research group in individuals with T1D (11). However, the potential influence of smoking on the sTWEAK concentration appears to be a complex issue that remains to be fully elucidated. Cigarette smoke-mediated oxidative stress will induce an inflammatory response, which leads to producing proinflammatory, chemotactic mediators and oxygen radicals (28). TWEAK has been proposed to be evolved as a protection against the development of potential harmful inflammatory responses (29). Furthermore, it has also been reported that under proinflammatory conditions, TWEAK expression is down-regulated (30). Therefore, we can speculate that smoking could decrease TWEAK levels, inducing an inflammatory response and thus increasing the risk of diabetes as observed in our study.

In our study, we found that decreased concentrations of sTWEAK were related not only to insulin resistance and diabetes, but also to the MetS, a cluster of metabolic abnormalities that increases the risk of CVD (31). Thus, the results of our study are in accordance with those of other studies that demonstrate an association between low sTWEAK concentrations and the risk of CVD (32, 33).

Although our data support the existence of etiological associations, the biological mechanisms through which low circulating levels of sTWEAK increase the risk of diabetes remain speculative and require further study. TWEAK is a multifunctional cytokine whose effects depend on the type of cell and the stage of the disease (9). Recently, we have demonstrated that the TWEAK/Fn14 axis may be a new component of the network that participates in the inflammatory imbalance of the pathogenesis of insulin resistance in obesity and T2D (34). Interestingly, TWEAK acts by binding to Fn14, a highly inducible cell-surface receptor that is linked to several intracellular signaling pathways, including the nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) pathway, which is associated with its proinflammatory effect (35–37). In addition, several studies have demonstrated that in both monocytes and adipocytes from patients with obesity or T2D, the activation of the proinflammatory transcription factor NF- $\kappa$ B can release

proinflammatory mediators that may interfere with insulin signaling and cause insulin resistance (35, 37–39). On the other hand, it has been demonstrated that Fn14 expression was up-regulated in human adipose tissues in severe obesity and that the presence of T2D did not affect the expression of TWEAK according to the obesity status (36). However, Fn14 expression was increased mainly in morbidly obese T2D women (34). Thus, the decreased concentrations of sTWEAK in those participants who developed T2D (96% of whom were obese) observed in our study may reflect the uptake of this molecule by its receptor (Fn14), which leads to peripheral decreased serum concentrations. Our study found no relation between the serum concentrations of sTWEAK and sCD163. Despite this, it is also possible that sTWEAK levels may also be decreased by clearance via its scavenger receptor CD163. In fact, previous data from other groups have shown that CD163-expressing macrophages can sequester and internalize sTWEAK, thus leading to reduced serum concentrations (40, 41).

In the present study, serum sCD163 concentrations are not a useful marker for T2D. This contrasts with results reported by Møller et al (19) in a general population. Differences in the design and the study population could explain the discrepancies between the results. Our population was older and at higher cardiovascular risk than the population of the Copenhagen City Heart Study (CCHS) enrolled from the general population and aged 20 years and older. More importantly, data on fasting glucose measurements at baseline were not available in the CCHS, so adjustments could not be made for glucose, an important predictor of diabetes that tends to attenuate the association between sCD163 and diabetes. Importantly, in our study we also observed a significant direct association between sCD163 concentrations and HOMA-IR in the whole population, which suggests a direct relationship between the level of insulin resistance and the peripheral concentrations of this molecule, as shown in previously reported studies (17, 18).

Finally, some authors have demonstrated a relationship between the sCD163/sTWEAK ratio and the presence of atherosclerotic diseases (40, 41), suggesting that this ratio could be a biomarker of clinical and subclinical atherosclerosis. To the best of our knowledge, our study is the first to have tested the extent to which this ratio can be considered a biomarker of diabetes risk. Although the sCD163/sTWEAK ratio was associated with HOMA-IR, it was not found to be independently associated with the risk of diabetes.

We are aware that our study has limitations, but it also has strengths that should be mentioned. First, a major limitation is that the population studied was composed of

elderly individuals with insulin resistance or other CVD risk factors. Therefore, our findings cannot be extrapolated to young and healthy individuals. Another limitation of our study is inherent to the study design. In nested case-control studies, nondiseased persons from whom the controls are selected may not be fully representative of the original cohort. So, it will be important in the future to assess prospectively the association between serum levels of both biomarkers and risk of developing T2D in other cohorts assessing all the cohort members at baseline. One of the strengths of our study over previous studies is that the diagnosis of diabetes was not self-reported and was verified by a second analytical test, thus making the identification of new incident cases more reliable. In addition, in our study, cases were ascertained by an independent Clinical End-Point Adjudication Committee, whose members were unaware of the study-group assignments and other clinical data. Other strengths of our study include the relatively large number of incident cases, a long follow-up period, inclusion of individuals of both sexes, and detailed standardized assessment of and control for a large number of potential confounding variables.

In summary, in the present study we demonstrated that decreased serum levels of sTWEAK are independently associated with T2D development. Further studies are warranted to confirm these findings in different populations and to elucidate the mechanisms explaining these findings.

## Acknowledgments

The authors thank the participants for their enthusiastic collaboration, the PREDIMED personnel for excellent assistance, and the personnel of all affiliated primary care centers. We thank Joan Vila from the Institut Municipal d'Investigació Mèdica for his statistical assessment.

Address all correspondence and requests for reprints to: Jordi Salas-Salvadó, Human Nutrition Unit, Faculty of Medicine and Healthy Sciences, Universitat Rovira i Virgili, C/ Sant Llorenç, 21, 43201 Reus, Spain. E-mail: jordi.salas@urv.cat. Or Matilde R. Chacón, Research Unit, University Hospital of Tarragona Joan XXIII, c/o Dr Mallafre Guasch, 4, 43007 Tarragona, Spain. E-mail: mrodriguez.hj23.ics@gencat.cat.

Clinical Trial Registry no. ISRCTN35739639.

This study was funded in part by the Spanish Ministry of Health (ISCIII), PI11/00049, PI1001407, G03/140, RD06/0045, FEDER (Fondo Europeo de Desarrollo Regional). None of the funding sources played a role in the design, collection, analysis, or interpretation of the data or in the decision to submit the manuscript for publication. The Human Nutrition Unit belongs to the Centre Català de la Nutrició, Institut d'Estudis Catalans, Catalunya. M.R.C. is supported by a research stabilization program (CP06/00119) from the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), cofinanced by the Institut Català de Salut (ICS) from

Catalonia. CIBERobn and CIBERDEM is an initiative of ISCIII, Madrid, Spain.

A.D.-L. and J.S.-S. had full access to all the data in the study and take full responsibility for the integrity and accuracy of the data analysis. Author contributions included: study concept and design—M.A.M.-G., M.I.-C., R.E., and J.S.-S.; analysis and interpretation of data—A.D.-L., M.B., E.M.-M., M.R.C., J.V., and J.S.-S.; drafting of the manuscript—A.D.-L. and J.S.-S.; statistical analysis—A.D.-L., M.B., and J.S.-S. All authors critically revised and approved the final version of the manuscript.

Disclosure Summary: The authors have no conflict of interest affecting the conduct or reporting of the work submitted.

## References

1. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract.* 2010;87:4–14.
2. Roglic G, Unwin N. Mortality attributable to diabetes: estimates for the year 2010. *Diabetes Res Clin Pract.* 2010;87:15–19.
3. Sanada H, Yokokawa H, Yoneda M, et al. High body mass index is an important risk factor for the development of type 2 diabetes. *Intern Med.* 2012;51:1821–1826.
4. Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001;280:E745–E751.
5. Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haefen TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet.* 2005;365:1333–1346.
6. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest.* 2006;116:1793–1801.
7. Goldberg RB. Cytokine and cytokine-like inflammation markers, endothelial dysfunction, and imbalanced coagulation in development of diabetes and its complications. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94:3171–3182.
8. Chicheportiche Y, Bourdon PR, Xu H, et al. TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J Biol Chem.* 1997;272:32401–32410.
9. Burkly LC, Michaelson JS, Hahm K, Jakubowski A, Zheng TS. TWEAKing tissue remodeling by a multifunctional cytokine: role of TWEAK/Fn14 pathway in health and disease. *Cytokine.* 2007;40:1–16.
10. Wiley SR, Winkles JA. TWEAK, a member of the TNF superfamily, is a multifunctional cytokine that binds the TweakR/Fn14 receptor. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003;14:2412–2449.
11. Llaurado G, Gonzalez-Clemente JM, Maymo-Masip E, Subias D, Vendrell J, Chacon MR. Serum levels of TWEAK and scavenger receptor CD163 in type 1 diabetes mellitus: relationship with cardiovascular risk factors. A case-control study. *PLoS One.* 2012;7:e43919.
12. Kralisch S, Ziegelmeier M, Bachmann A, et al. Serum levels of the atherosclerosis biomarker sTWEAK are decreased in type 2 diabetes and end-stage renal disease. *Atherosclerosis.* 2008;199:440–444.
13. Blanco-Colio LM, Martín-Ventura JL, Muñoz-García B, et al. Identification of soluble tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (sTWEAK) as a possible biomarker of subclinical atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:916–922.
14. Bover LC, Cardó-Vila M, Kuniyasu A, et al. A previously unrecognized protein-protein interaction between TWEAK and CD163: potential biological implications. *J Immunol.* 2007;178:8183–8194.
15. Moller HJ, Peterslund NA, Graversen JH, Moestrup SK. Identification of the hemoglobin scavenger receptor/CD163 as a natural soluble protein in plasma. *Blood.* 2002;99:378–380.
16. Axelsson J, Moller HJ, Witasp A, et al. Changes in fat mass correlate

- with changes in soluble sCD163, a marker of mature macrophages, in patients with CKD. *Am J Kidney Dis.* 2006;48:916-925.
17. Zanni MV, Burdo TH, Makimura H, Williams KC, Grinspoon SK. Relationship between monocyte/macrophage activation marker soluble CD163 and insulin resistance in obese and normal-weight subjects. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2012;77:385-390.
  18. Parkner T, Sørensen LP, Nielsen AR, et al. Soluble CD163: a biomarker linking macrophages and insulin resistance. *Diabetologia.* 2012;55:1856-1862.
  19. Møller HJ, Frikke-Schmidt R, Moestrup SK, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. Serum soluble CD163 predicts risk of type 2 diabetes in the general population. *Clin Chem.* 2011;57:291-297.
  20. Martínez-González MÁ, Corella D, Salas-Salvadó J, et al. Cohort profile: design and methods of the PREDIMED study. *Int J Epidemiol.* 2012;41:377-385.
  21. Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, et al. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *N Engl J Med.* 2013;368:1279-1290.
  22. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2013;36(suppl 1):S67-S74.
  23. Elosua R, Marrugat J, Molina L, Pons S, Pujol E. Validation of the Minnesota leisure time physical activity questionnaire in Spanish men. The MARATHOM Investigators. *Am J Epidemiol.* 1994;139:1197-1209.
  24. Schröder H, Fitó M, Estruch R, et al. A short screener is valid for assessing Mediterranean diet adherence among older Spanish men and women. *J Nutr.* 2011;141:1140-1145.
  25. Redon J, Coca A. Guidelines for the diagnosis, evaluation and treatment of hypertension: the point of view of the Spanish Society of Hypertension [in Spanish]. *Med Clin (Barc).* 2003;121:739-740.
  26. Yilmaz MI, Carrero JJ, Ortiz A, et al. Soluble TWEAK plasma levels as a novel biomarker of endothelial function in patients with chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009;4:1716-1723.
  27. Chorianopoulos E, Jarr K, Steen H, Giannitsis E, Frey N, Katus HA. Soluble TWEAK is markedly upregulated in patients with ST-elevation myocardial infarction and related to an adverse short-term outcome. *Atherosclerosis.* 2010;211:322-326.
  28. Gonçalves RB, Coletta RD, Silvério KG, et al. Impact of smoking on inflammation: overview of molecular mechanisms. *Inflamm Res.* 2011;60:409-424.
  29. Maecker H, Varfolomeev E, Kischkel F, et al. TWEAK attenuates the transition from innate to adaptive immunity. *Cell.* 2005;123:931-944.
  30. Chicheportiche Y, Fossati-Jimack L, Moll S, Ibnou-Zekri N, Izui S. Down-regulated expression of TWEAK mRNA in acute and chronic inflammatory pathologies. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;279:162-165.
  31. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation.* 2005;112:2735-2752.
  32. Blanco-Colio LM, Martín-Ventura JL, Carrero JJ, et al. Vascular proteomics and the discovery process of clinical biomarkers: the case of TWEAK. *Proteomics Clin Appl.* 2011;5:281-288.
  33. Yilmaz MI, Sonmez A, Ortiz A, et al. Soluble TWEAK and PTX3 in nondialysis CKD patients: impact on endothelial dysfunction and cardiovascular outcomes. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2011;6:785-792.
  34. Chacón MR, Richart C, Gómez JM, et al. Expression of TWEAK and its receptor Fn14 in human subcutaneous adipose tissue. Relationship with other inflammatory cytokines in obesity. *Cytokine.* 2006;33:129-137.
  35. Winkles JA. The TWEAK-Fn14 cytokine-receptor axis: discovery, biology and therapeutic targeting. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7:411-425.
  36. Vendrell J, Maymó-Masip E, Tinahones F, et al. Tumor necrosis-like weak inducer of apoptosis as a proinflammatory cytokine in human adipocyte cells: up-regulation in severe obesity is mediated by inflammation but not hypoxia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95:2983-2992.
  37. Zhong L, Luo Y, Huang C, Liu L. Effect of NF- $\kappa$ B decoy on insulin resistance of adipocytes from patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab.* 2011;37:520-526.
  38. Austin RL, Rune A, Bouzakri K, Zierath JR, Krook A. siRNA-mediated reduction of inhibitor of nuclear factor- $\kappa$ B kinase prevents tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced insulin resistance in human skeletal muscle. *Diabetes.* 2008;57:2066-2073.
  39. Shoelson SE, Lee J, Yuan M. Inflammation and the IKK  $\beta$ /I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B axis in obesity- and diet-induced insulin resistance. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2003;27(suppl 3):S49-S52.
  40. Urbonaviciene G, Martín-Ventura JL, Lindholt JS, et al. Impact of soluble TWEAK and CD163/TWEAK ratio on long-term cardiovascular mortality in patients with peripheral arterial disease. *Atherosclerosis.* 2011;219:892-899.
  41. Moreno JA, Muñoz-García B, Martín-Ventura JL, et al. The CD163-expressing macrophages recognize and internalize TWEAK: potential consequences in atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2009;207:103-110.