



**INFLAMACIÓ COM A NEXE D'UNIÓ ENTRE OBESITAT I COMPLICACIONS
METABÒLIQUES: ESTEATOSI HEPÀTICA**
Anna Rull Aixa

Dipòsit Legal: T-1516-2011

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

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

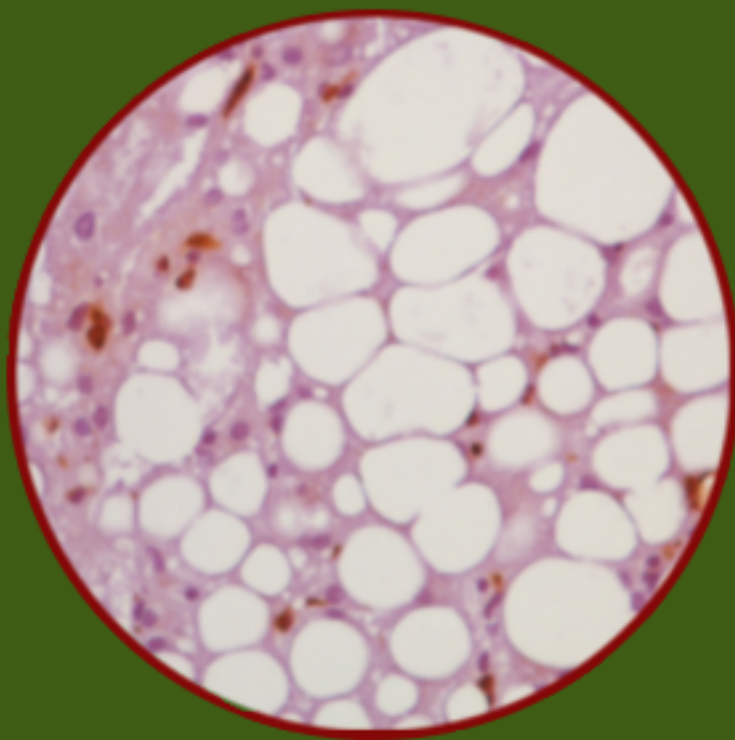
WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction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

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLAMACIÓ COM A NEXE D'UNIÓ ENTRE OBESITAT I COMPLICACIONS METABÒLIQUES: ESTEATOSI
HEPÀTICA.

Anna Rull Aixa
DL: T-1516-2011

Departament de Medicina i Cirurgia

INFLAMACIÓ COM A NEXE D'UNIÓ ENTRE OBESITAT I COMPLICACIONS METABÒLIQUES: ESTEATOSI HEPÀTICA



Anna Rull Aixa

Tesi Doctoral 2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLAMACIÓ COM A NEXE D'UNIÓ ENTRE OBESITAT I COMPLICACIONS METABÒLIQUES: ESTEATOSI
HEPÀTICA.

Anna Rull Aixa
DL: T-1516-2011

Anna Rull Aixa

**INFLAMACIÓ COM A NEXE D'UNIÓ ENTRE
OBESITAT I COMPLICACIONS
METABÒLIQUES: ESTEATOSI HEPÀTICA**

TESI DOCTORAL

dirigida pel

Dr. Jorge Joven Maried

Departament de Medicina i Cirurgia



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Reus

2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLAMACIÓ COM A NEXE D'UNIÓ ENTRE OBESITAT I COMPLICACIONS METABÒLIQUES: ESTEATOSI
HEPÀTICA.

Anna Rull Aixa
DL: T-1516-2011



FACULTAT DE MEDICINA I CIÈNCIES DE LA SALUT
DEPARTAMENT DE MEDICINA I CIRURGIA

Carrer Sant Llorenç, 21
43201 Reus
Tel. 977 759 306
Fax. 977 759352

FAIG CONSTAR que aquest treball, titulat "Inflamació com a nexa d'unió entre obesitat i complicacions metabòliques: Esteatosi Hepàtica", que presenta Anna Rull Aixa, ha estat realitzat sota la meua direcció al Centre de Recerca Biomèdica de l'Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili i que aconsegueix els requeriments per poder optar al títol de Doctor.

Reus, 10 de Juny de 2011

El director de la tesi doctoral

Dr. Jorge Joven Maried

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLAMACIÓ COM A NEXE D'UNIÓ ENTRE OBESITAT I COMPLICACIONS METABÒLIQUES: ESTEATOSI
HEPÀTICA.

Anna Rull Aixa
DL: T-1516-2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLAMACIÓ COM A NEXE D'UNIÓ ENTRE OBESITAT I COMPLICACIONS METABÒLIQUES: ESTEATOSI
HEPÀTICA.

Anna Rull Aixa
DL: T-1516-2011

*“La vida es como una leyenda.
No importa que sea larga, sino
que esté bien narrada.”*

L.A. Séneca

Als meu pare

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLAMACIÓ COM A NEXE D'UNIÓ ENTRE OBESITAT I COMPLICACIONS METABÒLIQUES: ESTEATOSI
HEPÀTICA.

Anna Rull Aixa
DL: T-1516-2011

AGRAÏMENTS

La vida està plena de moments per agrair les coses que ens passen i els moments tan especials que vivim, però són poques les ocasions en les que aprofitem per fer-ho. Són constant les persones que passen per la nostra vida i que sense adonar-nos ens ajuden a créixer i viure el dia a dia, doncs bé que millor que una Tesi per aturar-me a mirar enrere i donar-vos les gràcies a tots vosaltres que l'heu fet possible.

En primer lloc, al Dr. Jorge Joven, el meu tutor de tesi, sens dubte el millor tutor i professor que hagués pogut tenir. Gràcies per donar-me l'oportunitat d'aprendre a moure'm pel món de la recerca, cada dia hi ha una lliçó per compartir. Gràcies pel teu suport com a persona, sempre que et necessitem estàs aquí. I al Dr. Carlos Alonso-Villaverde, per formar part d'aquesta família professional tan especial, gràcies pel teu suport incondicional que tan ens ajuda a tirar endavant.

Al Dr. Jordi Camps per donar-me l'oportunitat de compartir les seves vivències com investigador i com a persona en el dia a dia d'un laboratori,...i al seu equip de Ponòlegs tan especials...Thanks Barthelemy&Mike!

A tota la gent que ha format i forma part del CRB. A aquells que ens van donar el seu relleu i de la mà de qui vam començar aquesta nova etapa de la nostra vida: Mònica, Blai, Neus...i en especial a la Natàlia, que ens continues ajudant, sempre procurat que estiguéssim bé, gràcies guapa!. Al Fernando, que des de Colòmbia sempre ens continua donant ànims i ens va ensenyar que el seu ritme de vida realment és diferent. A la Mònica i l'Esther amb qui vam compartir molts moment i a qui els hi hem d'agrair tot el treball que van realitzar perquè nosaltres tinguéssim resultats. Menys mal que ens vareu deixar a l'Alba, gràcies per formar part de l'equip del CRB, pels moments que vivim cada dia i per ajudar-nos especialment en els nostres estudis. A les noves incorporacions, Anabel i Esther, és d'agrair que gent nova vulgui seguir els nostres passos. Esther, gràcies per la teva disponibilitat, per la teva dedicació i el teu esforç per aprendre, tens molt de futur per davant.

A la meua família professional: la Judit, el Gerard i el Raül, quatre desconeguts que hem tingut la sort de coincidir al CRB, i que el dia a dia ens ha fet créixer junts i ens ha convertit en grans amics. Judit, gràcies per la teva comprensió i per la teua manera tan positiva de veure la vida, gràcies per confiar sempre tant en mí i donar-me tants ànims professionals i personals allà on estiguis. Gerard, el meu company de taula i de feinetes, gràcies per tot. Sempre estàs quan et necessito, gràcies per escoltar-me, per ajudar-me, i per aconsellar-me. Ets una persona extraordinària. Raül, el meu company de laboratori, d'estabulari i de menjador. Gràcies per estar sempre al meu costat disposat a ajudar-me en tot el que pots, gràcies per confiar sempre en mí, ets genial. Gràcies a tots per tot el que hem viscut i que no oblidarem mai.

A la gent que també forma part de la comunitat hospitalària: adjunts, tècnics, residents i "secres", dels Laboratoris clínics, que hem vareu acollir en el vostre món i em vareu ensenyar el dia a dia. A l'Àngeles, que cada tarda compartia amb nosaltres una estoneta. Als metges que d'alguna manera formeu part del CRB i que ens doneu

un gran suport, la Laura i el Txema. A les veïnes biobankers, Lúdia, Carme i Jordina, hem crescut amb vosaltres. Gràcies per estar sempre disposades a ajudar-nos.

A la gent de la Facultat: les nenes de la URLA, gràcies per sempre la vostra disponibilitat a compartir els nostres recursos i vivències. A la Fàtima per ser tan especial i procurar sempre per nosaltres. A la gent de l'estabulari, Àmparo, Esperanza i Juan, que sense vosaltres la nostra recerca no seria possible. A la gent del Serveis Científic-Tècnics de la URV, en especial al grup de metabòmica. Mariona gràcies pel teu ajut.

A la gent de l'hospital de Sant Pau, Joan Carles, Noe, Laurade qui tan vaig aprendre. Gràcies per acollir-me sempre tan bé als vostres laboratoris.

A la gent del IISPV que ens donen el suport per poder realitzar els nostres estudis i projectes. En especial, a la Neus i la Rebeca, gràcies noies per estar sempre disposades a donar-me un cop de mà, sou genials.

Als meus amics, els de sempre i els que ens hem anat trobant per formar aquest grup tan especial que tenim avui, ja sabeu qui sou (..a les 22,30 a hisenda?). Gràcies pel vostre suport i per totes les experiències que compartim i que ens fan gaudir de la vida. Gràcies!!! Meri, gràcies per ser una gran amiga, gràcies per considerar-me una germana, simplement gràcies per ser com ets, ets extraordinària.

A la Pepi, l'Àngel i l'Elí, per acollir-me com una més des del primer dia en la vostra família. Gràcies per estar disposat sempre a ajudar-me a mi i als meus. Moltes gràcies per tot!

A la meva petita però gran família. En especial, al meu avi, un home de ciència, que sempre s'ha interessat pel que feia i continua fent-ho, perquè sempre m'ha donat el seu suport incondicional. I la Sílvia que sempre està darrera els meus passos.

Als meu germà. David gràcies per ser tan afectuós i proper, gràcies pel teu bon humor, gràcies per estar sempre tan pendent de nosaltres i per no deixar d'intentar aixecar-nos el bon humor. Gràcies per ser com ets! Ets una gran persona!

Als meus pares, Maria Teresa i Eugeni, per donar-m'ho tot. Gràcies per l'educació que ens heu donat i els valors personals i familiars amb els que ens heu educat. Gràcies perquè sempre heu estat al meu costat i m'heu donat suport incondicional. Gràcies al meu pare, qui em va ensenyar que la vida sempre s'ha de viure al màxim, sense deixar perdre ni un moment. Encara que ja no estigui amb nosaltres, sempre serà el meu exemple a seguir. Gràcies a la meva mare, gràcies ser sempre tan optimista amb la vida, gràcies per estar sempre pendent de nosaltres, gràcies per escoltar-nos i aconsellar-nos, gràcies per ser una persona tan forta que ens ha ensenyat a estar units. Gràcies pel dia a dia, gràcies per tot!

I finalment, a l'Antonio. Gràcies per ser el millor amic i el millor company. Gràcies per estar al meu costat. Gràcies per la paciència que sempre tens, gràcies per escoltar-me i valorar-me, per donar-me ànims i no deixar mai que em desanimi, per estar sempre al meu costat, als bons i mals moments. Gràcies per demostrar-me dia a dia el teu afecte i el teu amor, no té preu. Ets una persona extraordinària a qui admiro. Aquesta tesi també és teva.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLAMACIÓ COM A NEXE D'UNIÓ ENTRE OBESITAT I COMPLICACIONS METABÒLIQUES: ESTEATOSI
HEPÀTICA.

Anna Rull Aixa
DL: T-1516-2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLAMACIÓ COM A NEXE D'UNIÓ ENTRE OBESITAT I COMPLICACIONS METABÒLIQUES: ESTEATOSI
HEPÀTICA.

Anna Rull Aixa
DL: T-1516-2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLAMACIÓ COM A NEXE D'UNIÓ ENTRE OBESITAT I COMPLICACIONS METABÒLIQUES: ESTEATOSI
HEPÀTICA.

Anna Rull Aixa
DL: T-1516-2011

PRESENTACIÓ i JUSTIFICACIÓ

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLAMACIÓ COM A NEXE D'UNIÓ ENTRE OBESITAT I COMPLICACIONS METABÒLIQUES: ESTEATOSI
HEPÀTICA.

Anna Rull Aixa
DL: T-1516-2011

L'obesitat i les malalties associades, com l'arteriosclerosi, la resistència a la insulina o l'esteatosi hepàtica, són el principal problema de la medicina moderna. La seva resolució dependrà del coneixement que puguem adquirir de com els factors genètics i ambientals afavoreixen l'augment de pes i de com el pes excessiu pot donar trastorns del metabolisme. Pensem que al considerar la inflamació com un mecanisme comú de resposta, l'estudi pot ser simplificat. La inflamació s'ha considerat tradicionalment com un mecanisme de defensa, molt lligat a la supervivència de l'espècie, per la seva capacitat de combatre les infeccions o restaurar el dany produït. No obstant, l'exposició de l'organisme a un estat d'inflamació perllongat produeix un efecte totalment contrari, conduint l'organisme a un estat d'inflamació agut que lluny de dependre dels clàssics instigadors dels processos d'inflamació tradicionals, s'associa a un mal funcionament dels teixits. Tant en el sobrepès com en l'obesitat, l'excés de nutrients inicia un cicle d'excés d'adipositat que desencadena en una situació on la complexitat entre les vies del sistema immune i del metabolisme es troben, i donen peu a complicacions metabòliques com diabetis, esteatosis hepàtica, problemes respiratoris i/o arteriosclerosi. Així doncs, sembla evident que per mantenir l'equilibri energètic sota condicions metabòliques diverses és imprescindible la coordinació entre les vies metabòliques implicades en el control de nutrients i la resposta immune. Aquesta coordinació requereix un complex entramat de cèl·lules, hormones i citoquines on la vies relacionades amb la inflamació i les vies del metabolisme convergeixen a diferents nivells i entre els diferents òrgans (**1-CAPITOL 1**). De entre tots ells, el fetge és l'òrgan encarregat de controlar l'homeòstasi energètica global de tot l'organisme, essent el principal regulador del metabolisme dels lípids i de la glucosa. De fet, l'acumulació excessiva de greix en els hepatòcits coneguda com esteatosi hepàtica, està considerada la manifestació de la síndrome metabòlica en el teixit hepàtic. L'esteatosi hepàtica és una malaltia inflamatòria que engloba una sèrie de desordres que comencen per la simple esteatosi, passant per l'esteatohepatitis, fibrosis i cirrosis, fins arribar en els casos més greus a carcinoma hepàtic. L'obesitat, la diabetis tipus 2, i la dislipèmia són alguns dels factors etiològics associats al desenvolupament i progressió de l'esteatosi hepàtica. Tradicionalment, l'esteatosi s'havia considerat un procés benigne però el fet que sigui un requeriment necessari pel desenvolupament d'esteatohepatitis (infiltració de cèl·lules inflamatòries al teixit hepàtic), el converteix en un risc metabòlic important pel desenvolupament de diabetis i malalties vasculars. I tot i que l'obesitat no és una condició necessària per desencadenar la presència d'esteatosi,

la majoria de pacients que en presenten són obesos i presenten complicacions metabòliques associades (1-CAPÍTOL 2).

Els nostres esforços s'han centrat en l'estudi dels mecanismes d'actuació d'una molècula implicada en els processos d'inflamació, la proteïna quimioatracent de monòcits-1 (MCP-1), una proteïna que fou originalment descoberta per les seves funcions immunològiques i sobretot, com el seu nom indica, pel seu paper fonamental en el trànsit de monòcits cap a la lesió arterioscleròtica (1-CAPÍTOL 3). L'estudi de les citoquines, més concretament de les quimioquines, s'està intensificant notablement en els darrers anys. El nostre interès per MCP-1 prové de les dades experimentals i clíniques recollides en estudis previs del nostre grup i que ens van fer pensar que MCP-1 no només estaria implicada en la inflamació sinó que també tindria un paper clau en l'homeòstasi metabòlica, i per tant podria ser una bona diana terapèutica. D'aquí en va sorgir l'ESTUDI 1, publicat a *Experimental & Molecular Pathology*. El coneixement de MCP-1 no podia quedar estancat en el paper que desenvolupa en la patogènesis de l'arteriosclerosi, sinó que s'havia d'ampliar a altres complicacions metabòliques. Necessitàvem saber quin era el paper MCP-1 en el metabolisme, i per tant l'estudi de la inflamació en l'obesitat i les malalties associades, amb especial interès per l'esteatosi hepàtica donat que el fetge és un òrgan clau en el control metabòlic. Els resultats positius obtinguts en el primer treball on es mostraven que efectivament MCP-1 estava implicada en el control del metabolisme dels lípids i de la glucosa, van servir per posar en marxa el treball presentat en l'ESTUDI 2 publicat a la revista *Cytokine*. En aquest treball es pretenia valorar si l'expressió de MCP-1 en el fetge podia tenir efecte sobre el desenvolupament de l'esteatosi hepàtica utilitzant un model animal que presenta esteatosi hepàtica induïda per la dieta. Els resultats van ser evidents, l'expressió hepàtica de MCP-1 està sobre-regulada per la dieta i contribueix al desenvolupament i progressió de l'esteatosi hepàtica. Quedava esbrinar com l'expressió d'una molècula tan petita podia actuar sobre les vies metabòliques del fetge, i per això es necessitava caracteritzar les molècules implicades en el desenvolupament i progressió de l'esteatosi. D'aquí l'ESTUDI 3 publicat al *Journal of Proteome Research*, on definim els canvis metabòlics que es produeixen en el model on prèviament havíem vist que l'expressió hepàtica de MCP-1 estava sobre-regulada. El següent pas és veure que passa quan realment MCP-1 no s'expressa al teixit hepàtic, avaluant els canvis en l'expressió de gens i metabòlits que es produeixen en el fetge quan hi ha una deficiència de MCP-1.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLAMACIÓ COM A NEXE D'UNIÓ ENTRE OBESITAT I COMPLICACIONS METABÒLIQUES: ESTEATOSI
HEPÀTICA.

Anna Rull Aixa
DL: T-1516-2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLAMACIÓ COM A NEXE D'UNIÓ ENTRE OBESITAT I COMPLICACIONS METABÒLIQUES: ESTEATOSI
HEPÀTICA.

Anna Rull Aixa
DL: T-1516-2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLAMACIÓ COM A NEXE D'UNIÓ ENTRE OBESITAT I COMPLICACIONS METABÒLIQUES: ESTEATOSI
HEPÀTICA.

Anna Rull Aixa
DL: T-1516-2011

ÍNDEX

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLAMACIÓ COM A NEXE D'UNIÓ ENTRE OBESITAT I COMPLICACIONS METABÒLIQUES: ESTEATOSI
HEPÀTICA.

Anna Rull Aixa
DL: T-1516-2011

I	INTRODUCCIÓ	1-40
Capítol 1	Inflamació i metabolisme	3
Capítol 2	L'esteatosi hepàtica	17
Capítol 3	La proteïna quimioattractant de monòcits 1 (MCP-1 o CCL2)	25
Capítol 4	Paper dels models animals en l'estudi del metabolisme	37
II	HIPÒTESI I OBJECTIUS	41
III	RESULTATS	45-78
Estudi 1	<i>Deficiency in monocyte chemoattractant protein-1 modifies lipid and glucose metabolism</i>	47
Estudi 2	<i>Hepatic monocyte chemoattractant protein-1 is upregulated by dietary cholesterol and contributes to liver steatosis</i>	55
Estudi 3	<i>Metabolomic assessment of the Effect of Dietary cholesterol in the Progressive Development of Fatty Liver Disease</i>	65
IV	DISCUSSIÓ I CONCLUSIONS	87-96
Discussió		89
Conclusions		95
V	REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES	97-108
VI	ANNEXES	109-142
Annex 1	<i>Insulin Resistance, Inflammation, and Obesity: Role of Monocyte Chemoattractant Protein-1 (or CCL2) in the Regulation of Metabolism</i>	111
Annex 2	<i>Expression of cytokine genes in the aorta is altered by the deficiency in MCP-1:Effect of a high-fat, high-cholesterol diet</i>	125
Annex 3	<i>Metabolic phenotyping of genetically modified mice: An NMR metabonomic approach</i>	135
VII	ALTRES	143-150
Llistat de Publicacions i Congressos		145
Abreviatures		149

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLAMACIÓ COM A NEXE D'UNIÓ ENTRE OBESITAT I COMPLICACIONS METABÒLIQUES: ESTEATOSI
HEPÀTICA.

Anna Rull Aixa
DL: T-1516-2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLAMACIÓ COM A NEXE D'UNIÓ ENTRE OBESITAT I COMPLICACIONS METABÒLIQUES: ESTEATOSI
HEPÀTICA.

Anna Rull Aixa
DL: T-1516-2011

I *INTRODUCCIÓ*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLAMACIÓ COM A NEXE D'UNIÓ ENTRE OBESITAT I COMPLICACIONS METABÒLIQUES: ESTEATOSI
HEPÀTICA.

Anna Rull Aixa
DL: T-1516-2011

CAPÍTOL 1

INFLAMACIÓ I METABOLISME

Mediators of Inflammation 2010 (2010) 326580 (Annex 1)

1. Introducció

La incidència de l'obesitat i les malalties associades s'ha vist incrementada en el decurs de les últimes dècades, fins convertir-se en un problema epidemiològic important de la societat actual. Les dades¹ indiquen que el sobrepès i l'obesitat són el cinquè factor de risc per defunció en el món. L'Organització Mundial de la Salut estima que aproximadament un bilió d'adults de més de 20 anys presenten sobrepès, dels quals més de 200 milions d'homes i més de 300 milions de dones són obesos. Encara més alarmants són les dades que indiquen un increment similar d'obesitat infantil, al 2010 aproximadament 43 milions de nens menors de 5 anys presentaven sobrepès. L'obesitat representa un elevat risc de desenvolupar complicacions metabòliques, resistència a la insulina, diabetis tipus 2, esteatosis hepàtica, aterosclerosi o inclús desordres degeneratius, tals com demència, problemes respiratoris i fins i tot alguns tipus concrets de càncer. Els menors que presenten obesitat tenen dificultats respiratòries, major risc de fractures, hipertensió, i marcadors primerencs de malaltia cardiovascular o resistència a la insulina. L'obesitat infantil s'associa a una major probabilitat d'obesitat, mort prematura i discapacitat a l'edat adulta.

La inflamació s'ha considerat tradicionalment com un mecanisme de defensa, molt lligat a la supervivència de l'espècie, per la seva capacitat de combatre les infeccions o restaurar el dany produït. No obstant, l'exposició de l'organisme a un estat d'inflamació prolongat, produeix un efecte totalment contrari, situació principalment originada pels nutrients. Tant l'excés de nutrients com un estat de desnutrició poden alterar les funcions del sistema immune, conduint l'organisme a un estat d'inflamació agut que lluny de dependre dels clàssics instigadors dels processos d'inflamació tradicionals, s'associa a un mal funcionament tissular, i per tant a un problema en la regulació de l'homeòstasi

¹ Dades recollides per l'Organització Mundial de la Salut (OMS) en la nota descriptiva N° 311 (Març 2011)

energètica. Així doncs, sembla evident que per mantenir l'equilibri energètic sota condicions metabòliques diverses és imprescindible la coordinació entre les vies metabòliques implicades en el control de nutrients i la resposta immune. Aquesta coordinació requereix un complex entramat de cèl·lules, hormones i citoquines on la vies relacionades amb la inflamació i les vies del metabolisme convergeixen a diferents nivells, per la implicació conjunta d'òrgans, teixits i cèl·lules.

2. *Relació entre inflamació i metabolisme*

La supervivència de l'espècie depèn directament de la capacitat de l'organisme a fer front a les infeccions i reparar el dany produït, però també a la capacitat de l'organisme en processar i emmagatzemar energia per afrontar possibles estats de restricció alimentària o situacions de demanda energètica elevada. La cadena evolutiva demostra com dos processos tan independents com metabolisme i sistema immune, estan estretament connectats. Són múltiples les hormones, citoquines, proteïnes, factors de transcripció o lípids que actuen independentment tant en el metabolisme com en els processos inflamatoris, i que inclús en ocasions actuen com a reguladors entre ambdues vies de senyalització [1-3].

Aquesta relació entre inflamació i metabolisme, que en condicions normals és beneficiosa pel manteniment d'un bon estat de salut, resulta perjudicial quan l'organisme presenta complicacions metabòliques, com ho demostra la immunosupressió present en els individus amb desnutrició [4]. Al llarg de l'evolució humana s'ha vist que les condicions perllongades de restricció alimentària són un perill molt important per la salut, situacions que han permès establir un vincle real entre la inflamació i els dèficits alimentaris [4]. Tot i que aquesta situació continua essent evident per l'elevat nombre de persones que encara pateixen els efectes de la desnutrició, hem de reconèixer que durant l'última dècada l'evolució ha donat un gir i ens hem trobat que el problema dels països desenvolupats recau en l'efecte oposat, l'excés constant de nutrients que esdevé sobrepès i que en moltes ocasions acaba en obesitat (Figura 1) [2,5]. Tant en el sobrepès com en l'obesitat, l'excés de nutrients inicia un cicle d'excés d'adipositat que desencadena en una situació on la complexitat entre les vies del sistema immune i del metabolisme es troben, i donen peu a complicacions metabòliques com diabetis, esteatosis hepàtica, problemes respiratoris i/o arteriosclerosi [1].

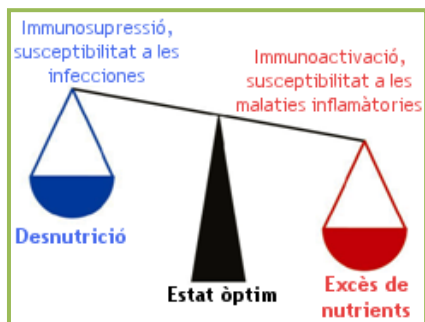
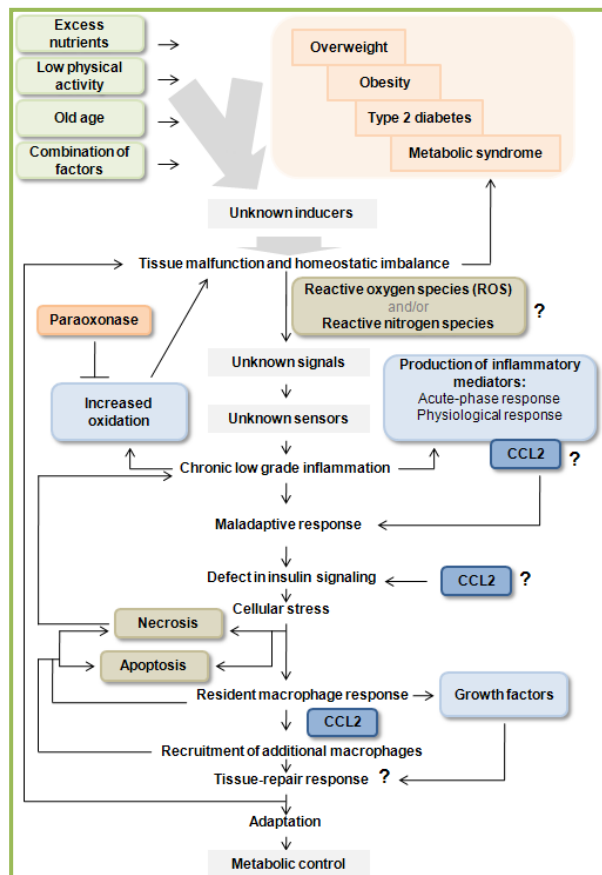


Figura 1. Inflamació i metabolisme. Tant un estat de mal nutrició com un estat amb excés de nutrients poden alterar les funcions del sistema immune. *Adaptació de Wellen & Hotamisligil 2005 [2].*

Fa més d'una dècada que el grup del *Dr. Hotamisligil* [6] demostrava amb el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) l'estreta relació entre inflamació i obesitat. Nivells elevats d'aquesta molècula inflamatòria van ser identificats en el teixit adipós de ratolins amb obesitat, i en el teixit adipós i múscul de pacients obesos [6-9]. Es va veure que l'administració de TNF- α recombinant en models cel·lulars i en models animals d'experimentació era perjudicial en les vies de senyalització vinculades a l'acció de la insulina [6]. En ratolins obesos la deficiència de les funcions de TNF- α va resultar una teràpia de millora a la sensibilitat de la insulina i l'homeòstasi de la glucosa, confirmant així que la resposta inflamatòria té un paper clau en la regulació de l'acció de la insulina en l'obesitat [6,9]. A partir d'aquesta troballa es va anar fent més evident que l'obesitat era un estat crònic d'inflamació, i que a la resposta de TNF- α s'havien de sumar la implicació d'altres molècules inflamatòries, com les quimioquines (ex. MCP-1/CCL2, proteïna quimioattractant de monòcits 1) i citoquines (ex. IL-1, Interleuquina 1).

A partir d'aleshores, la visió tradicional dels processos d'inflamació ha necessitat ser revisada i ampliada. Són diversos els instigadors i mediadors de la resposta inflamatòria en els teixits on s'hi produeix un procés d'estrès metabòlic, i que tot i ser encara molt desconeguts divergeixen d'aquells que s'associen als processos d'infecció o dany cel·lular (Figura 2) [5]. Els instigadors d'aquesta resposta inflamatòria poden ser de naturalesa exògena o endògena al compartiment cel·lular. Els inductors endògens d'inflamació es classifiquen en dos grups, depenen si són d'origen microbial o no-microbial. Els inductors endògens es defineixen com senyals cel·lulars conseqüència de l'estrès, el dany o el mal funcionament dels teixits. L'experiència en el tractament de complicacions metabòliques ha evidenciat que aquests instigadors i mediadors endògens de resposta inflamatòria estan estretament vinculats a l'excés de nutrients, el sedentarisme, l'edat o la combinació de factors que condueixen a episodis clínics cada cop més habituals en la nostra societat com són el sobrepès, l'obesitat, la diabetis tipus 2, la resistència a la insulina, l'esteatosi

hepàtica, entre d'altres, o simplement la combinació de tots ells en l'anomenada síndrome metabòlica. En totes aquestes condicions, un excés en els processos d'oxidació cel·lular (majoritàriament oxidació de lípids), particularment en el teixit adipós, és un fenomen comú, que permet l'activació de cèl·lules inflamatòries que augmenten encara més l'oxidació, convertint tots aquests processos en un cercle viciós, lluny de ser resolt [3,5]. Fins al moment, les molècules candidates a ser inductors d'aquesta condició cel·lular podrien estar relacionades amb la producció de radicals lliures (ROS) i/o espècies



reactives de nitrogen. Un excés en la producció de ROS a les mitocondries produeix una situació inestable que infligeix dany oxidatiu que activa les cascades de senyalització inflamatòries a l'interior de l'endoteli cel·lular. Com a resposta pròpia de la cèl·lula s'activa la producció de molècules involucrades en els processos d'oxidació cel·lulars, com les paraoxonases, les quals també tenen un paper important en la conversió de les lipoproteïnes a senyals inflamatòries, degut a l'oxidació dels lípids i les proteïnes que les componen [10,11].

Figura 2. Els processos inflamatoris i el control cel·lular del metabolisme convergeixen a diferents nivells. L'excés de nutrients, el sedentarisme, l'edat, o la combinació de tots ells desencadena una resposta d'inflamació sistèmica on les quimiocines tenen un paper clau. Figura de *Rull A 2010 [5, Annex 1]*.

Sembla ser que l'acumulació de l'excés de lípids pot tenir efectes biològics que actuen per vies desconegudes. No obstant, tot i la naturalesa d'aquests hipotètics instigadors de la resposta inflamatòria, aquests elements han de ser suficients per poder desencadenar la producció de mediadors d'inflamació, els quals al final acaben alterant el funcionament normal de diversos teixits i poden ser classificats en diferents grups d'acord amb les seves propietats bioquímiques. D'aquest mediadors, les citoquines inflamatòries (com TNF- α o IL6) activen l'endoteli i els leucòcits i indueixen una resposta de fase aguda. Particularment, les quimioquines (com MCP-1) controlen el flux de leucòcits i la quimiotaxis envers als teixits afectats. No obstant, l'acció de les quimioquines i altres mediadors no es limita a efectes locals, i aquestes molècules poden efectuar funcions neuroendocrines i metabòliques si assumeixen un paper general més important en la inflamació i el control de l'homeòstasi tissular [12].

En condicions normals, les cèl·lules es troben en una situació basal. El primer pas necessari per induir una seqüència d'esdeveniments passa per estressar les cèl·lules, per les quals un excés de disponibilitat de nutrients és condició suficient. La resposta a aquest estrès consisteix en una situació complexa, i no completament entesa, d'adaptació que es probablement regulada per macròfags residents de teixits. La seva funció bàsica inclou la retirada de cèl·lules mortes quan es necessari i el manteniment de l'homeòstasi tissular per una varietat de mecanismes específics de teixit, incloent-hi un increment de producció de factors de creixement i altres senyals que poden alterar el funcionament normal dels teixits [13]. Quan l'adaptació cel·lular falla i la nutrició inadequada arriba a nivells extrems, macròfags addicionals són reclutats a l'interior cel·lular per ajudar els teixits a l'adaptació d'aquesta situació particular d'estrès. El reclutament de macròfags en resposta al mal funcionament cel·lular, devingut per l'excessiva acumulació de lípids, ha estat ben documentada en els adipòcits i els hepatòcits, i un increment de producció de molècules inflamatòries (com MCP-1) ha estat identificat com a probable mediador [14]. Òbviament, si els processos d'adaptació no són possibles, la cèl·lula mor. Quan els macròfags reconeixen cèl·lules necròtiques, una resposta inflamatòria externa és induïda, però alternativament, hi pot haver un eliminació de cèl·lules mortes si aquestes són reconegudes com apoptòtiques. Les conseqüències son clares, hi ha un balanç net de pèrdua cel·lular, que necessita ser compensat per la generació de noves cèl·lules de la mateixa classe. Aquest procés requereix un canvi substancial en el paper dels macròfags i d'altres cèl·lules per produir factors de creixement que promouran la proliferació cel·lular en una resposta de reparació tissular. El resultat serà probablement conseqüència de

L'activació de vies de senyalització desconegudes amb un efecte intens en el control del metabolisme dels teixits i/o cèl·lules afectades [15,16].

3. Com l'obesitat pot iniciar un procés inflamatori?

En l'obesitat són múltiples els processos que desencadenen l'inici d'una inflamació sistèmica, tot i que encara queden molts enigmes per resoldre en la recerca del quan i del com una malaltia com l'obesitat pot iniciar una resposta inflamatòria. Tot sembla indicar que la resposta inflamatòria s'inicia en els adipòcits, els primers tipus cel·lular afectats en el desenvolupament de l'obesitat, i en els tipus cel·lulars propers als adipòcits que es troben afectats pel creixement massiu del teixit adipós (Figura 3). L'excés de nutrient provoca un estat d'estrès metabòlic important, en el que la producció de radicals lliures (estrès oxidatiu) en les mitocòndries i l'estrès del reticle endoplasmàtic activa la producció de molècules inflamatòries, TNF- α o MCP-1 [17]. La secreció de TNF- α en el teixit adipós estimula la secreció de MCP-1 en els pre-adipòcits. De forma molt similar, les cèl·lules endotelials poden segregar MCP-1 en resposta a les citoquines. Així pre-adipòcits i cèl·lules endotelials es converteixen en responsables de l'atracció de macròfags al teixit adipós, que acabaran activant una resposta inflamatòria en adipòcits veïns, i que conduirà a l'augment de la inflamació local que potenciarà la resistència a la insulina en òrgans susceptible de la seva acció, majoritàriament pàncrees, fetge i múscul.

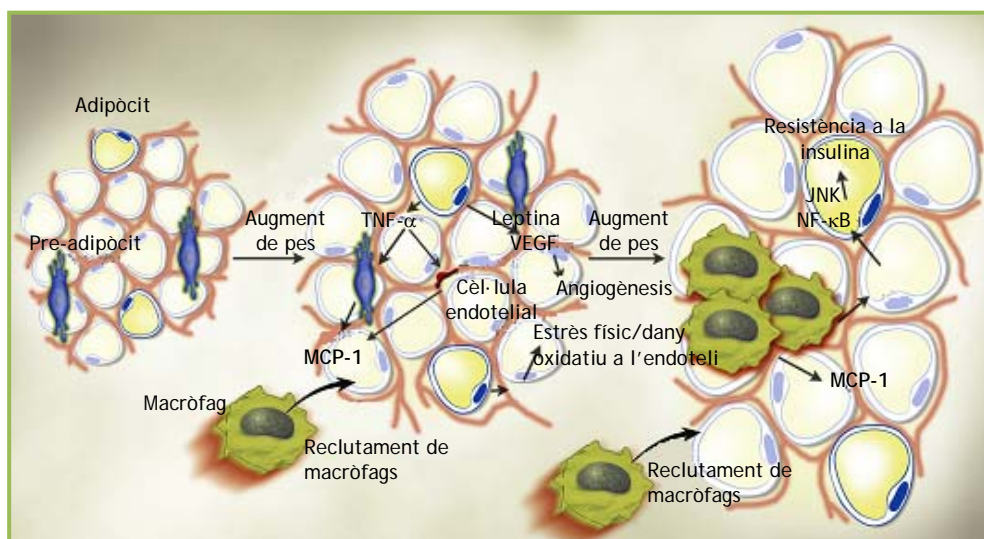


Figura 3. L'obesitat provoca canvis estructurals importants en el teixit adipós que indueixen l'activació de processos inflamatoris en el propi teixit i que s'aniran estenen cap a la resta d'òrgans involucrats en l'acció de la insulina. Els macròfags seran els responsables de començar aquest cercle viciós. *Adaptació de Wellen & Hotamisligil 2003 [17].*

a. *L'estrès del reticle endoplasmàtic*

Els models experimentals indiquen que el reticle endoplasmàtic (RE) és l'òrgan essencial per iniciar i a la vegada integrar les vies dels processos inflamatoris i l'acció de la insulina en l'obesitat i la diabetis tipus 2 (Figura 4) [18,19]. El RE és un orgànul format per un conjunt de cavitats aplanades, conductes i làmines limitades per una membrana, que intervé en la síntesi de proteïnes i lípids, i que fa la funció d'emmagatzemar i transportar determinades substàncies, i que s'encarrega de l'ensamblatge correcte de les proteïnes secretores i de membrana (estructura secundària i terciària). Les proteïnes que en resulten mal plegades, parcialment o totalment incorrectes són detectades, eliminades i degradades. No obstant, l'acumulació de proteïnes incorrectes, la fluctuació dels nivells de nutrients i d'energia, la hipòxia cel·lular o un increment important en la demanda de síntesi de proteïnes en el RE acaben provocant una condició d'estrès cel·lular. En aquestes condicions, el RE activa una resposta complexa en el sistema (*UPR: unfolded protein response*) per intentar restaurar la funcionalitat íntegra d'aquest orgànul [19,20], que passa per l'activació de tres molècules localitzades a les membranes del RE [21]:

- a. la inositol quinasa que requereix la activitat enzimàtica 1 (IRE-1)
- b. la quinase pancreàtica del reticle endoplasmàtic (PERK), que actua mitjançant la fosforilació de la subunitat α del factor 2α d'iniciació de translació eucariota (eIF2 α)
- c. el factor de transcripció activador 6 (ATF6), de la família dels factors de transcripció CREB i ATF.

En condicions normals, aquests tres sensors d'estrès de RE es troben en un estat inactiu per associació amb abundants xaperones del RE, anomenades BIP. En condicions d'estrès, les BIP (*immunoglobulin-heavy-chain-binding protein*, també anomenades HSPA5 i GRP78) es segreguen per unió a proteïnes mal plegades, o incorrectes, activant els sensors d'estrès del RE [22]. La resposta més immediata a l'activació de les BIP per la via de PERK, és l'homodimerització i la trans-fosforilació de PERK, que en últim terme permetrà la fosforilació d'eIF2 α , inhibint la síntesi de proteïnes. Tanmateix, la fosforilació d'eIF2 α

és necessària per la translació de determinats RNA missatgers que contenen seqüències reguladores, com ATF-4. ATF4 pot induir l'expressió de gens UPR, els quals estan involucrats en la biosíntesi i transport d'aminoàcids, la resposta de l'estrès oxidatiu, i les processos d'apoptosi induïts per l'estrès del RE [23].

Paral·lelament, l'estrès del RE potencia l'autofosforilació d'IRE-1 α fent que s'activi la seva activitat RNAsa. En aquest moment, IRE-1 α es capaç de remodelar la seqüència de mRNA que codifica per XBP-1 (X-box-binding protein 1), convertint aquesta molècula en un potent factor de transcripció [20,21].

Per altra banda, quan ATF6 és alliberat de BIP, aquest es situa a l'aparell de Golgi on les proteases S1P i S2P dividiran ATF6 en diferents fragments que seran alliberats al citosol cel·lular, i que migraran cap al nucli per activar-ne la transcripció. Seran les mateixes proteases SP1 i SP2 les que també s'encarregaran de dividir el factor SREBP, necessari per la síntesi de colesterol i àcids grassos [24]. Els fragments d'ATF6 i la isoforma potencialment activa de XBP1 actuen paral·lelament en la inducció de gens de transcripció que codifiquen les xaperones del RE i enzims que promouen el plegament, maduració, secreció i degradació de proteïnes del RE. Però si la resposta no es suficient per resoldre l'estrès cel·lular que provoquen aquestes proteïnes incorrectes, i restaurar l'homeòstasi en el RE, la UPR iniciarà un procés d'apoptosi cel·lular per protegir l'organisme.

b. De l'estrès del reticle endoplasmàtic als processos inflamatoris

A l'interior de les cèl·lules, probablement els dos processos inflamatoris que actuen sobre l'acció de la insulina són la via de senyalització c-jun N-terminal kinase (JNK)-AP1, i la via de senyalització IKK-NF- κ B [19,25,26], per la seva estreta relació amb l'activació d'IRE-1 i PERK en els processos d'estrès del RE. IRE-1 està lligat a l'activació de JNK a través del factor 2 associat a TNF- α (TRAF2). L'activació tant de IRE-1 com PERK està a la vegada lligada a NF- κ B, per dues vies de senyalització diferents. Mentre IRE-1 interactua amb IKK per TRAF2, l'activació de PERK permet la degradació d'IKK i així facilita l'activitat de NF- κ B.

L'estrès del RE també està lligat a la generació i acumulació intracel·lular de radicals lliures i espècies reactives d'oxigen (ROS), situació que comporta estrès oxidatiu i iniciació de la resposta inflamàtoria [27]. Tanmateix, l'acumulació de proteïnes incorrectes en el citosol cel·lular augmenta la concentració de calci, que acabarà concentrant-se en la matriu mitocondrial, causant una despolarització de la membrana interna del mitocondri,

que suposarà un major augment de la producció de ROS. A aquestes espècies reactives, haurem de sumar-hi les espècies reactives de nitrogen que poden alterar l'estat oxidatiu i les concentracions de calci en el RE, causant estrès de RE i producció de ROS.

La resposta de fase aguda és un altre procés que hem de tenir en compte. CREBH es un factor de transcripció de fase aguda que s'ha identificat com a mediador de la resposta en els hepatòcits, i la seva expressió és altament induïda per citoquines inflamatòries [28]. CREBH es activat per la translocació del RE a l'aparell de Golgi, on es divideix per les proteases SP1 i SP2. El fragment N-terminal serà alliberat al citosol i serà conduït al nucli cel·lular, on pot acabar induint la transcripció.

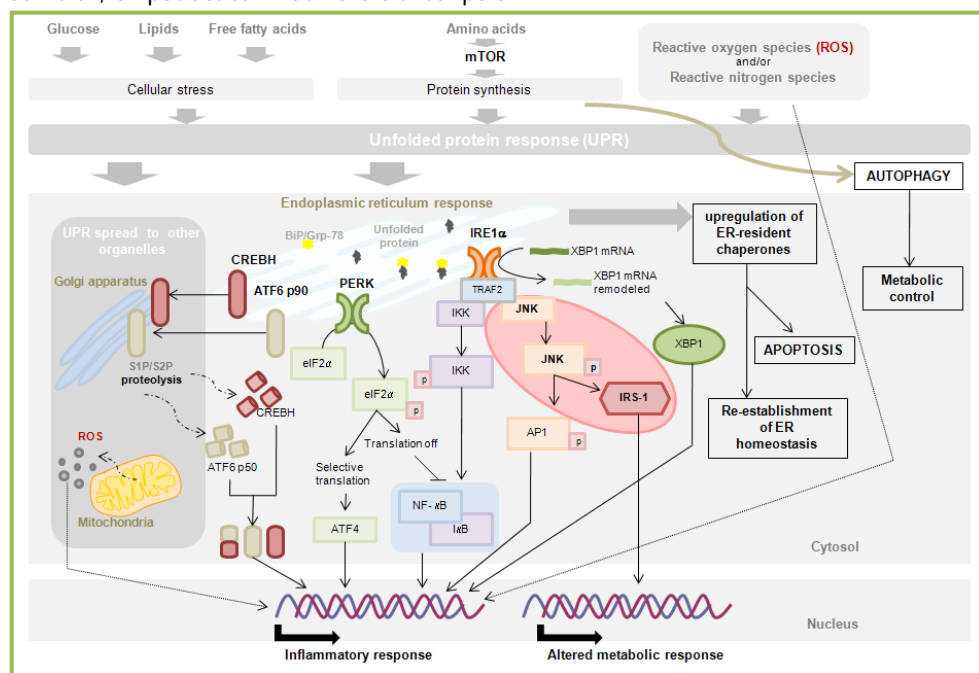


Figura 4. La resposta inflamatòria i metabòlica es pot interpretar com una resposta a l'estrès cel·lular. Les cèl·lules detecten i reaccionen a l'estrès del seu entorn. El RE és el principal contribuïdor degut al seu paper central en integrar un elevat nombre de senyals metabòliques per l'homeòstasi cel·lular. *Adaptació de Rull A 2010 [5].*

Finalment, hem de destacar que estudis recent mostren la relació entre l'estrès del RE i la via de senyalització de mTOR [29], essencial en la regulació de nombrosos processos, que inclouen el cicle cel·lular, el metabolisme energètic, la resposta immune i l'autòfagia. S'ha comprovat que l'autòfagia té un paper rellevant en el metabolisme dels lípids i que

podria tenir implicacions importants en les malalties on hi ha acumulació de lípids [30]. Tot i que els estudis que podem trobar són molt recent i preliminars, les similituds que s'han observat entre els processos d'autofàgia i la lipòlisis, junt amb la capacitat dels lisosomes a degradar lípids suggereixen que l'autofàgia condueix a la ruptura tant de les gotes de lípids (magatzem de lípids en les cèl·lules) com dels triglicèrids [30,31]. Tot i la poca informació que es té fins al moment, les dades experimentals indiquen diferències entre els processos d'autofàgia que es donen en els hepatòcits i en els adipòcits. En el teixit adipós, l'autofàgia regula l'acumulació de lípids mitjançant el control de la diferenciació dels adipòcits i determina el balanç entre els teixits adipós blanc i marró [31]. En els teixits no adiposos, com el fetge, l'autofàgia fa una funció protectora prevenint la lipotoxicitat per una disminució de l'acumulació hepàtica de lípids i promovent l'emmagatzematge segur de lípids en el teixit adipós.

c. *Contribució d'altres molècules del sistema immune*

Resultats *in vitro* han determinat l'existència de dos tipus de macròfags, M1 i M2, classificats en funció de l'activitat que presenten (Figura 5) [32-35]. En l'obesitat, s'ha vist com un considerable nombre del conjunt de macròfags de teixit de la classe M2 (*alternatively activated macrophages*) passa a formar part del conjunt de macròfags de teixit de tipus M1 (*classically-activated*) [34]. Aquest procés donarà com a resultat un canvi en la secreció de citoquines, que passaran de ser predominantment antiinflamatòries (M2) a pro-inflamatòries (M1). Els macròfags tipus M2 protegeixen del desenvolupament de la inflamació relacionada amb l'obesitat i la resistència a la insulina, bàsicament a través de la regulació de l'activitat del receptor de PPAR γ [35]. La producció dels macròfags tipus M1 està induïda per mediadors pro-inflamatoris, permet l'activació de la producció de citoquines pro-inflamatòries i la generació de molècules ROS. Aquest mecanisme cel·lular està probablement regulat per la via inflamatòria de quimiotaxis CCL2/CCR2 (*Capítol 3*).

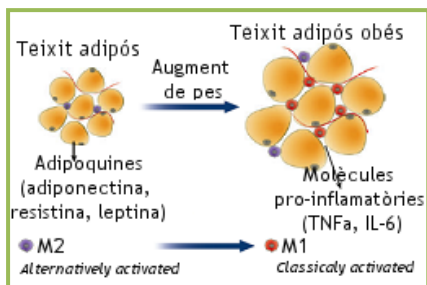
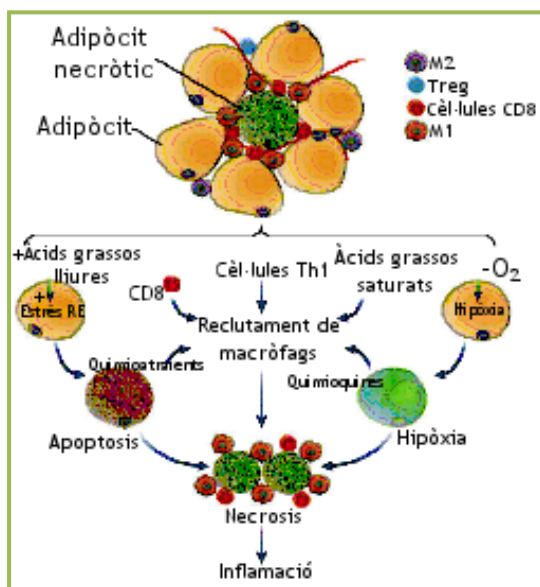


Figura 5. El teixit adipós allibera adipoquines sensibles a l'acció de la insulina sota la influència de macròfags tipus M2. En l'obesitat, el teixit adipós presenta una gran quantitat de macròfags tipus M1, que s'encarrega d'alliberar un nombre considerable de molècules pro-inflamatòries. *Adaptació de Odegaard 2011 [35].*

En l'obesitat es produeix un reclutament de monòcits CCR2* (*C-C motif chemokine receptor 2 positive*) cap a l'interior dels adipòcits que es diferencien en macròfags de tipus M1. L'entorn inflamatori que promou l'activació de M1 inclou el reclutament de cèl·lules CD8, reducció del nombre de cèl·lules reguladores T (*Tregs*), i increment en la producció de citoquines tipus Th1 (*Helper 1*). A més, com ja hem vist anteriorment, l'hipertrofia dels adipòcits indueix l'estress del RE i la hipòxia, ambdós factors promouen la mort cel·lular. En l'obesitat, s'ha vist com les cèl·lules CD8 i els macròfags tipus M1 formen un complex entremat entorn als adipòcits necròtics. Aquest increment dramàtic de macròfags tipus M1 en l'obesitat inhibeix les funcions dels macròfags M2, i com a conseqüència es produeix un augment de la inflamció (Figura 6).

Figura 6. Representació dels factors involucrats en el control del reclutament i l'activació de macròfags del teixit adipós. *Adaptació de Odegaard 2011 [35].*



4. La resposta inflamàtori dels teixits metabòlics en l'obesitat

L'efecte múltiple produït en els processos d'obesitat està associat a un defecte en el balança de l'homeòstasi i la resposta pro-inflamàtori del sistema immune (Figura 7) [36]. L'obesitat desencadena una cascada de senyalització inflamàtori a nivell d'hipotàlem i de teixit adipós, provocant una desregulació en el manteniment de la sensibilitat a la insulina i la leptina. Paral·lelament, l'acumulació ectòpica de lípids en el múscul i fetge, així com en la circulació sanguínia activa els leucòcits tissulars i contribueix a malalties específiques d'òrgans, promovent la resistència a la insulina sistèmica. En els illots pancreàtics, les citoquines inflamàtoies acceleren la progressió cap a la diabetis.

a. Pàncrees

Els processos inflamatoris poden reduir la secreció d'insulina i desencadenar l'apoptosi de cèl·lules β del pàncrees produint un engruïment dels illots pancreàtics, un fenomen

crític en la progressió de la diabetis [36 ,37]. Estudis experimentals ens han mostrat com en l'obesitat induïda per la dieta, els macròfags s'acumulen en els illots convertint-se en una font de citocines pro-inflamatòries que bloquegen la funció de les cèl·lules β .

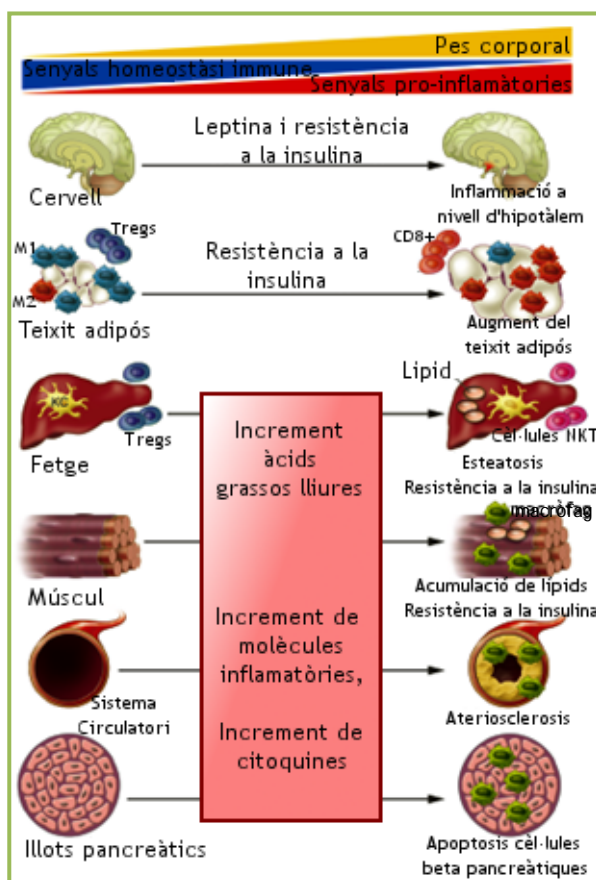
b. *Teixit adipós*

La resistència a la insulina del teixit adipós i la disfunció en l'emmagatzematge de lípids en els adipòcits és un procés essencial en la progressió de l'obesitat [18,38]. S'ha vist com el nombre de macròfags del teixit adipós i l'expressió dels gens coincideix amb el desenvolupament de la resistència a la insulina. Tanmateix, estudis recents determinen que aquests macròfags són tan sols uns mediadors de la resposta inflamatòria que inclou l'acumulació de cèl·lules CD8+, Th1-CD4+T, i la pèrdua de cèl·lules Tregs [39].

c. *Hipotàlem*

Estudis d'associació genòmica han localitzat nombrosos gens neuronals que afecten l'índex de massa corporal, suggerint que les variació en el control central del metabolisme podrien tenir una vinculació en el risc genètic de patir obesitat [40,41]. No obstant, cal remarcar que independent a l'obesitat, la inflamació a nivell d'hipotàlem perjudica l'acció de la insulina en els òrgans perifèrics, i a la vegada potència la presència d'hipertensió, majoritàriament a través de senyals del sistema nerviós simpàtic. Un sistema que pot induir canvis inflamatoris en el teixit adipós en resposta al dany neuronal [42].

Figura 7. La resposta tissular inflamatòria i metabòlica en l'obesitat. *Adaptació de Lumeng 2011 [36].*



d. *Múscul*

Els miòcits tenen la capacitat de respondre les senyals inflamatòries per receptors de reconeixent (PRRS) tals com TLR4 (*Toll-like receptor 4*) [8]. La inflamació en el múscul es troba lligada a la infiltració de macròfags induïts en el múscul obès [43].

e. *Fetge (Capítol 2)*.

L'esteatosi hepàtica és un factor de risc molt lligat a la resistència a la insulina, l'esteatohepatitis no alcohòlica, i la dislipèmia, independentment de l'adipositat visceral [44]. Són diversos els factors que es troben involucrats, inflamatoris i metabòlics, en el desenvolupament de l'esteatosi hepàtica (JNK, TLR4, l'estrès del RE). L'esteatosi hepàtica està associada a un increment de citocines M1/Th1 i cèl·lules del sistema immune [45,46].

RESUM DEL CAPÍTOL

- ✓ La incidència de l'obesitat i les malalties associades (la diabetis tipus 2, la resistència a la insulina, l'esteatosi hepàtica, o malalties cardiovasculars, entre d'altres) s'ha vist incrementada en el decurs de les últimes dècades, fins convertir-se en un problema epidemiològic important de la societat actual.
- ✓ L'excés de nutrients, la poca activitat, l'edat, o la combinació de tots aquests factors, habituals en la nostra societat, desencadenen una resposta d'inflamació sistèmica on les quimioquines tenen un paper clau.
- ✓ El mecanisme comú que dona pas a l'obesitat i les malalties associades és la inflamació crònica, promoguda principalment per l'activació de macròfags en el teixit adipós i fetge.
- ✓ El reticle endoplasmàtic (RE) és l'òrgan essencial per iniciar i a la vegada integrar les vies dels processos inflamatoris i l'acció de la insulina en l'obesitat i la diabetis tipus 2.
- ✓ En l'obesitat, el conjunt de macròfags de teixit tipus M2 (*alternatively activated macrophages*) passa a formar part del conjunt de macròfags de teixit M1 (*classically-activated*). Aquest mecanisme cel·lular està probablement regulat per la via inflamatòria de quimiotaxis CCL2/CCR2.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLAMACIÓ COM A NEXE D'UNIÓ ENTRE OBESITAT I COMPLICACIONS METABÒLIQUES: ESTEATOSI
HEPÀTICA.

Anna Rull Aixa
DL: T-1516-2011

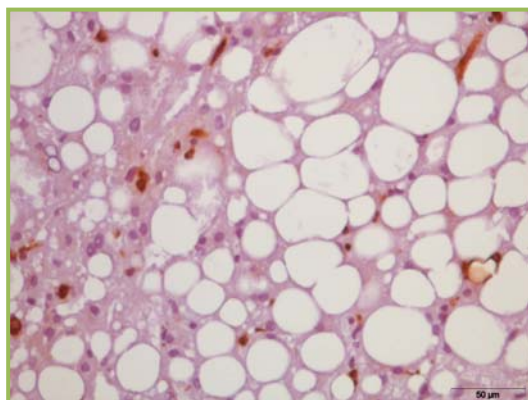
CAPÍTOL 2

L'ESTEATOSI HEPÀTICA

1. Introducció

L'esteatosi hepàtica és una malaltia inflamatòria que engloba una sèrie de desordres que comencen per la simple esteatosi, passant per l'esteatohepatitis, fibrosis i cirrosis, fins arribar en els casos més greus a carcinoma hepàtic. Tradicionalment, l'esteatosi s'havia considerat un procés benigne però el fet que sigui un requeriment necessari pel desenvolupament d'esteatohepatitis, el converteix en un risc metabòlic important pel desenvolupament de diabetis i malalties vasculares.

L'obesitat, la diabetis tipus 2, i la dislipèmia són alguns dels factors etiològics que estan associats a l'esteatosi hepàtica no alcohòlica (referida en aquest capítol com esteatosi hepàtica). No obstant, tot i que l'obesitat no és una condició necessària per desencadenar



la presència d'esteatosi, la majoria de pacients que en presenten són obesos i presenten complicacions metabòliques associades.

Figura 8. Biòpsia hepàtica d'un pacient amb obesitat mòrbida, on es pot apreciar una acumulació considerable de lípids, acompanyada per infiltració de macròfags (cèl·lules tenyides de marró).

L'esteatosi hepàtica es defineix com una acumulació de lípids dins l'interior dels hepatòcits. El control de lípids en els hepatòcits està regulat majoritàriament per hormones distals (ex. insulina) i factors del propi fetge, en una complexa interacció de diversos tipus cel·lulars procedents de diferents òrgans. Els triglicèrids del fetge són reconvertits en font d'energia per processos d'oxidació, exportats fora dels hepatòcits mitjançant partícules de molt baixa densitat (VLDL), o emmagatzemats en el propi fetge per situacions de requeriment energètic. L'esteatosi hepàtica es conseqüència d'un desequilibri en el control d'aquests lípids hepàtics. Un augment de triglicèrids en el fetge pot ser conseqüència de a) àcids grassos de la dieta que són emmagatzemats al fetge, i l'augment dels quals incrementa la resistència sistèmica de la insulina; b) la síntesi de *novo* que es produeix en el fetge; c) la re-circulació d'àcids grassos no-esterificats dels

bàsicament dos els factors de transcripció els implicats, SREBP1c (*sterol regulatory binding protein 1c*) i ChREBP (*carbohydrate response binding protein*). La insulina indueix la lipogènesi per una sobre-expressió de SREBP1c, que activa els gens implicats en la biosíntesi d'àcids grassos, com ACC i FAS [49]. L'efecte de la insulina sobre l'expressió de SREBP1c està bàsicament controlada pel receptor X del fetge (LXR), un factor que controla el pas de colesterol a àcids biliars en el fetge [50]. Per altra banda, ChREBP és activat tant per la glucosa com per la xylosa-5-fosfat, un producte via pentosa fosfat, fet que indica que aquest factor manté l'expressió dels gens involucrats en la biosíntesi d'àcids grassos hepàtics en els processos on hi ha excés de calories provinents de carbohidrats, convertint-se en un sensor clau dels nivells de glucosa hepàtica [51,52]. Cal destacar que estudis recent indiquen que el factor ChREBP és una diana directa per LXR [53], establint així LXR com a mediador lipogènic pel seu rol en l'augment de la síntesi d'àcids grassos. A més a més, el fet que s'hagi observat com la glucosa (*oxysterols*) pot activar LXR [54], converteix aquest receptor en una molècula integradora del metabolisme dels lípids i de la glucosa. En resum, LXR pot detectar l'excés de glucosa, pot induir la síntesi d'àcids grassos, i promou l'exportació de les VLDL [55].

En el fetge, la continua activitat de la *fatty acid transport protein 5* permet mantenir el consum calòric i el flux d'àcids grassos en el fetge [56]. Quan els nivells d'àcid grassos hepàtics augmenten, PPAR α (*peroxisome proliferator-activated receptor*) i PPARGC1 (*peroxisome proliferator-activated receptor γ co-activator 1*) són activats i promouen l'oxidació i la producció de VLDL, resultant en un aclariment dels àcids grassos [57]. Tanmateix, PPAR α actua directament amb PPARGC1, que conjuntament amb Foxa2 (*forkhead box protein a2*) estimulen l'oxidació d'àcids grassos i la producció de VLDL [57]. Com que la resistència a la insulina inhibeix la fosforilació de Foxa2, produint-ne la dissociació amb PPARGC1, aquesta via podria contribuir a l'aparició de l'esteatosi hepàtica [58]. Tanmateix, PPARGC1 incrementa SREBP1 i l'activitat transcripcional de LXR, acoblant la síntesi de lípids amb la secreció de lipoproteïnes [59].

L'oxidació dels àcids grassos està també promoguda per l'acció de l'adiponectina, un efecte que pot ser mediat via l'activació de PPAR α [60] o AMPK (adenosine-5'-monophosphate-activated protein kinase) [61]. AMPK disminueix la gluconeogènesi i la síntesi d'àcids grassos mentre que incrementa l'oxidació d'àcids grassos. Aquest efecte acumulatiu s'aconsegueix per aquest tres mecanismes independents, que inclouen la supressió de SREBP1 i ChREBP [62,63], i la inhibició de l'acetil-CoA carboxilasa que resulta

en un increment de l'oxidació per la disminució de manoil-CoA [64]. Finalment indicar que l'activació d'AMPK al fetge es pot produir via PPAR γ [65].

3. *La resistència a la insulina*

Un factor que promou el desenvolupament d'esteatosi hepàtica és la resistència a la insulina, que empitjora la supressió de la lipòlisis regulada per la insulina resultant en un increment en l'alliberació d'àcids grassos a la circulació [66]. La insulina promou la captació de glucosa a les cèl·lules per l'increment de l'expressió de transportadors de glucosa, promou la síntesi de glicogen, i inhibeix la gluconeogènesis. Tanmateix, la insulina és un important modulador de la formació i emmagatzematge de lípids promovent la síntesi de triglicèrids i inhibint la lipòlisis [67]. La resistència a la insulina està caracteritzada per un empitjorament de la captació de glucosa al múscul esquelètic i al teixit adipós [68]. La lipogènesis controlada per insulina resulta en un increment net d'àcids grassos alliberats del teixit adipós. En el fetge, la insulina és un potent inhibidor de la producció endògena de glucosa, procés empitjorat en presència de resistència a la insulina hepàtica.

Quan es produeix un estat de resistència a la insulina en el teixit adipós es produeix un increment d'àcids grassos en la circulació, conseqüència d'un augment de la lipòlisis, que altera el metabolisme hepàtic dels àcids grassos i promou el desenvolupament d'esteatosi hepàtica [66]. El diacilglicerol (DAG) és un producte de la lipogènesis que actua sobre la cascada de senyalització serine/threonine quinasa, que acabarà inhibint l'activitat tyrosine quinasa i interferint amb la capacitat de la insulina a fosforilar els residus de tirosina del receptor IRS2. Resultat d'aquesta acció és una disminució de l'activació de la PI3K (*fosfatidilinositol-3-quinasa*) i el factor Akt2, reguladors de l'activitat de GSK3 (*glycogen synthase kinase-3*) [69]. La disminució en l'activitat GSK resulta en una disminució en la captació de glucosa en el fetge mitjançant la insulina, i la reducció en l'estimulació d'insulina per producció de glucosa hepàtica. Tanmateix, una disminució en la fosforilació del factor FoxO (*forkhead box protein O*) permet la seva entrada al nucli cel·lular i per tant permeten l'activació de factors de transcripció d'enzims d'acció limitant en els processos de gluconeogènesis: PEPCK (*fosfoenolpyruvate carboxylasa*) i G6Pase (glucosa-6-fosfatasa) [69].

En la resistència a la insulina, FoxO activa la via de la gluconeogènesis però també promou la producció de VLDL per l'activació la proteïna de transcripció microsomal [70]. Els àcids grassos també poden causar resistència a la insulina per un fenomen independent de TNF-

α , per JNK [9]. L'augment de l'activitat JNK en l'esteatosi hepàtica empitjora la capacitat de senyalització del receptor de la insulina. Tanmateix, la resistència a la insulina està promoguda per l'activació de IKK i NF- κ B que en últim terme incrementen la producció i secreció de molècules inflamatòries, com IL-6 [71].

4. *Altres factors implicats en l'aparició d'esteatosi hepàtica*

La flora intestinal

La flora intestinal és adquirida en el moment del naixement i va patint un procés de recolonització al llarg de la vida en funció de factors com la dieta, el tractament amb antibiòtics, la higiene o les infeccions. En el humans, la flora intestinal està composta per uns 10^3 - 10^4 microorganismes, entre els que s'ha vist que la família dels *Bacteroidetes* i *Fimicutes* poden influir en el balanç energètic i l'emmagatzematge del greix [72-74]. La fermentació microbiana dels polisacàrids, no digeribles, a monosacàrids, i dels àcids grassos de cadena curta, amb la subsegüent absorció intestinal, estimula els síntesi *de novo* dels triglicèrids hepàtics per l'acció dels factors ChREBP i SREBP1 en el fetge [75,76]. Per altra banda, la supressió del factor ANGPTL4 (*angiopoietin-like protein 4*), produeix un increment de l'activitat lipoproteïna lipasa al teixit adipós [77]. Aquest fenomen facilita la lipòlisis de triglicèrids i l'alliberament d'àcids grassos del fetge que seran captats pel teixit adipós, promovent l'emmagatzematge de triglicèrids hepàtics i el desenvolupament de resistència a la insulina. Paral·lelament, amb una dieta rica en greix la flora microbiana té la capacitat de convertir la colina a metilamines per la seva excreció urinària [78]. La reducció en la capacitat de la colina per poder sintetitzar prou fosfatidilcolina per l'empaquetatge i secreció de les VLDL, comportarà un augment en l'acumulació de triglicèrids en fetge [79].

La flora intestinal també s'ha vist implicada en la gènesis de la resistència a la insulina mitjançant la implicació de l'endotoxina, un component de la paret dels bacteris gramnegatiu alliberat per la microflora intestinal, i que s'introdueix al fetge per la circulació sanguínia [80]. L'endotoxina estimula la resposta inflamatòria per la via de senyalització TLR4. L'activació de TLR4 activa directament la via de senyalització estudiada anteriorment IKK-NF- κ B, que actua directament sobre l'acció de la insulina, mitjançant l'increment en la producció de citoquines pro-inflamatòries (IL-6, TNF- α) [81,82].

La resposta del teixit adipós

L'absorció del greix de la dieta per part de l'intestí es realitza en forma de quilomicrons. En el teixit adipós, la lipoproteïna lipasa de l'endoteli hidrolitza els triglicèrids alliberant àcids grassos lliures que seran captats, re-esterificats a triglicèrids i emmagatzemats com dipòsits de greix. Un excés de carbohidrats i una situació d'hiperinsulinèmia activaran el factor ChREBP, promovent de nou els processos lipogènics en els adipòcits [83,84].

En el capítol anterior, hem vist com l'obesitat promou una acumulació de greix important en els adipòcits, activant la infiltració de macròfags en el seu interior que activarà la producció de TNF- α i disminuirà els nivells d'adiponectina. Aquestes molècules seran alliberades a la circulació i detectades pel fetge, que induirà la producció de molècules inflamatòries com a resposta de fase aguda. El conjunt d'aquestes molècules inflamatòries promouen la disfunció de l'endoteli, els processos d'aterogènesi i trombosis, com l'empitjorament del metabolisme de la glucosa que es traduirà en un estat de resistència a la insulina.

L'adiponectina és una proteïna específica del teixit adipós que s'ha vist reduïda en els processos d'esteatosi hepàtica. S'ha vist que existeix una correlació inversa entre els nivells d'adiponectina en sèrum i la quantitat de greix emmagatzemat en el teixit hepàtic, així com una correlació positiva entre els nivells d'adiponectina i la resistència a la insulina. Una altre proteïna que vincula el teixit adipós amb l'esteatosi hepàtica és la RBP4 (*retinol binding protein 4*). Aquesta proteïna que es troba incrementada en l'obesitat, s'ha vist directament implicada en la senyalització de la insulina en els adipòcits i en l'expressió hepàtica de PEPCK, que conseqüentment disminueix l'acció de la insulina sobre la supressió de la producció de glucosa.

5. Els efectes de l'esteatosi hepàtica en el fetge

L'estrès oxidatiu

L'estrès oxidatiu és el resultat d'un no balanç entre la producció de ROS i la capacitat dels antioxidants. La mitocòndria, concretament el sistema citocrom P450, i els peroxisomes representen una font important de producció de ROS. S'ha vist que en l'esteatosi hepàtica es produeix un defecte estructural de les mitocòndries associat a un empitjorament de la cadena respiratòria mitocondrial, que com a resultat produeix un estat d'oxidació i fosforilació que promou la producció de ROS [83,85]. Tanmateix, s'ha comprovat que el contingut de colesterol lliure en les mitocòndries és crític en el pas d'esteatosi a

esteatohepatitis, per la sensibilització dels hepatòcits a $TNF\alpha$ i FAS, i per la reducció de la concentració de glutatió mitocondrial [86].

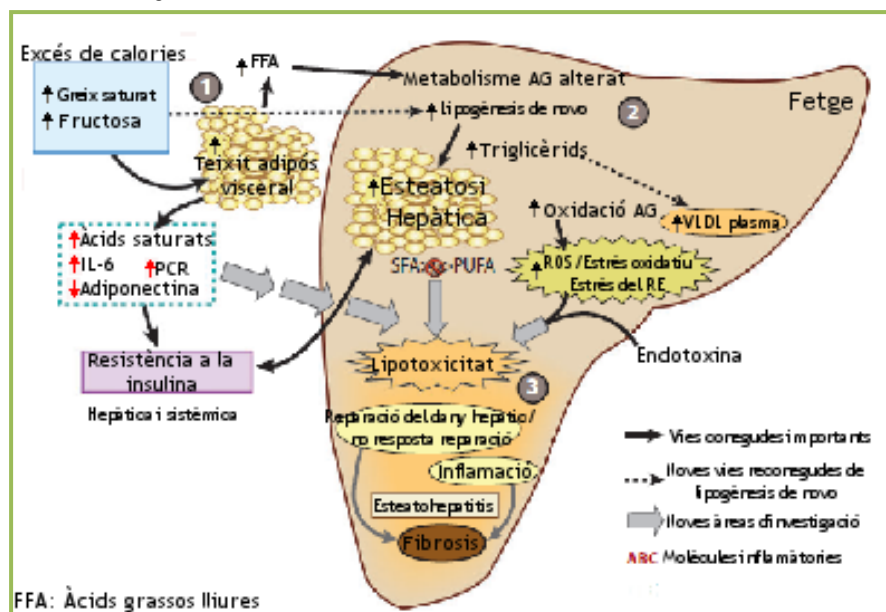


Figura 10. Visió general dels processos implicats en l'aparició d'esteatosi hepàtica i esteatohepatitis. Hi ha tres processos bàsics implicats: 1) increment de greix visceral, alteració sistèmica i resposta hepàtica a l'augment dels nivells d'insulina; 2) Alteració en l'exportació dels àcids grassos hepàtics, oxidació i dessaturació en l'interior del fetge; i 3) Iniciació i els conseqüents efectes de la lipotoxicitat. *Adaptació de Tiniakos 2010 [84].*

Apoptosi cel·lular

Els hepatòcits pateixen els efectes de la citotoxicitat de l'estrès oxidatiu, que condueix a mort cel·lular amb necrosi i apoptosi, amb el conseqüent increment dels processos inflamatoris [84]. S'ha comprovat que en l'esteatosi hepàtica la proteïna anti-apoptòtica BCL2 (*B-cell lymphoma formation*) es troba significativament augmentada [87].

L'estrès del RE i la UPR

Els pacients amb esteatosi hepàtica presenten un activació de la UPR [83,88]. S'ha vist com l'activació de IRE-1 juga un paper important en el pas d'esteatosi hepàtica a esteatohepatitis, per la via de la fosforilació de JNK. En els pacients amb esteatohepatitis, tot i trobar-se un increment de la fosforilació del factor eIF2 α , s'ha

observat una aparent incapacitat de regulació sobre els factors ATF4 i CHOP, contribuint així a l'error en un intent de reconstituir l'estrès del RE.

Activació dels processos inflamatoris

La inflamació hepàtica contribueix a la resistència a la insulina i possiblement als processos de risc cardiovascular per l'activació d'una inflamació sistèmica [83,89]. Aquesta inflamació és en part causada per les citoquines. S'ha vist com l'expressió intrahepàtica i/o plasmàtica de TNF- α i IL-6 està augmentada en l'esteatosi hepàtica i en l'esteatohepatitis. Aquests factors es troben sota el control de la via de senyalització NF- κ B i JNK.

RESUM DEL CAPÍTOL

- ✓ L'esteatosi hepàtica és una malaltia associada a l'obesitat i és la causa principal pel desenvolupament de malalties hepàtiques cròniques en adult i infants.
- ✓ El fetge és l'òrgan regulador de l'homeòstasi energètica global de l'organisme, essent el principal regulador del metabolisme dels lípids i de la glucosa.
- ✓ Tot i que són múltiples els factors de transcripció implicats en el desenvolupament d'esteatosi hepàtica cal destacar-ne: SREBP1, ChREBP, AMPK i mTOR.
- ✓ La resistència a la insulina, és un dels factors que promou el desenvolupament d'esteatosi hepàtica pel seu efecte en la supressió de la lipòlisis regulada per la insulina, resultant un increment en l'alliberació d'àcids grassos a la circulació.
- ✓ En l'esteatosi hepàtica és produeix un a) defecte estructural de les mitocondries que produeix un estat d'oxidació que condueix a mort cel·lular i b) una activació de la URP, clau en el pas d'esteatosi hepàtica a esteatohepatitis (inflamació) per la via de la fosforilació de JNK.
- ✓ La inflamació hepàtica contribueix a la resistència a la insulina i possiblement als processos de risc cardiovascular per l'activació d'una inflamació sistèmica.

CAPÍTOL 3

LA PROTEÏNA QUIMIOATRAIENT DE MONÒCITS-1 (MCP-1 O CCL2)

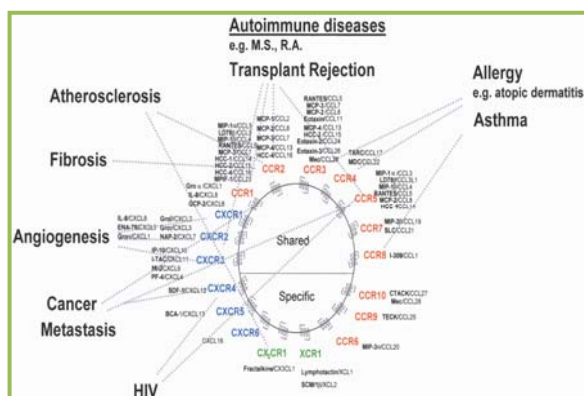
Mediators of Inflammation 2010 (2010) 326580 (Annex 1) i

Cytokine 50 (2010) 121-128 (Annex 2)

1. Introducció

Les quimioquines són un superfamília de petites molècules secretades i induïdes per diferents factors amb implicacions importants en l'homeòstasi i els processos patològics de l'organisme. Tot i que el seu descobriment inicial les catalogava com a molècules encarregades de dirigir la migració leucocitària i intervenir en una ampla varietat de processos fisiològics i patològics, fonamentalment de caràcter immunitari e inflamatori, són diversos els estudis que els hi han donat un paper crític en els processos metabòlics (Figura 11). Les quimioquines tenen la capacitat de transmetre senyals cel·lulars que generen múltiples respostes, moltes de les quals no estan relacionades amb la seva funció quimiotàctica. És freqüent que s'assumeixi, que al contrari de les hormones, les quimioquines puguin influir en les activitats cel·lulars d'una manera autocrina i paracrina. Són nombroses les malalties de caràcter inflamatori o infeccioses on s'ha detectat una secreció important d'una o varies quimioquines. En aquest tipus de malalties, les quimioquines són responsables de l'acumulació i l'activació de leucòcits en els diferents teixits. La capacitat de tenir un control precís sobre el moviment de les cèl·lules inflamatòries suggereix que són nombroses les quimioquines i els seus receptors els que podrien aportar noves dianes terapèutiques d'intervenció.

Figura 11. Visió general dels processos on les quimioquines es troben implicades.



2. *Les Quimioquines*

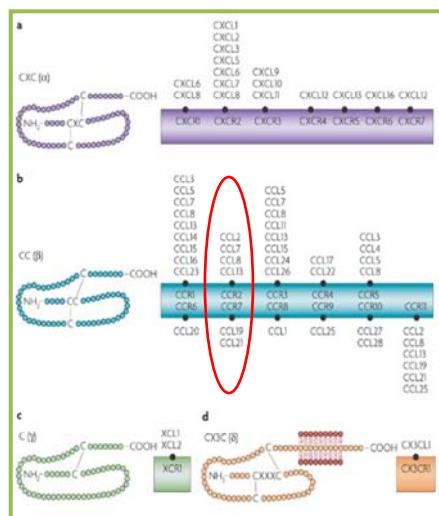
Les quimioquines són proteïnes de baix pes molecular (8-14 kDa) constituïdes per un nombre variable de entre 60 i 100 aminoàcids, amb un alta homologia de seqüència amb aquests (20-90%) [90-92]. Exceptuant algun cas concret, les quimioquines presenten quatre residus de cisteïna completament conservats que formen dos ponts disulfur dintre d'aquestes petites proteïnes. Les quimioquines es subdivideixen en 4 famílies, en funció del nombre i de la posició concreta dels residus de cisteïna en la posició N-terminal (Figura 12). Aquestes famílies són: CXC (subfamília α), CC (subfamília β), C (subfamília γ) i C3XC (subfamília δ). Les quimioquines exerceixen les seves funcions biològiques mitjançant la unió específica a receptors de la superfície cel·lular, provocant d'aquesta manera senyals químiques potents que alteren el patró d'expressió dels gens en les cèl·lules. Cal remarcar que la interacció de les quimioquines amb els seus receptors es caracteritza pel fet que la majoria d'aquests receptors són capaços d'interaccionar amb múltiples lligands, i que a la vegada, la majoria dels lligands interaccionen amb més d'un receptor.

Tant les quimioquines com els seus corresponents receptors són molècules mediadores en la migració dels leucòcits als llocs d'inflamació [92]. El procés de pas de leucòcits des del reg sanguini fins als diferents teixits és un procés on s'hi troben involucrades una sèrie d'interaccions produïdes entre els propis leucòcits i les cèl·lules endotelials. Hi ha 4 passos fonamentals:

1. Activació de les cèl·lules endotelials per la presència de molècules pro-inflamatòries (LPS, TNF, etc.). En resposta, les cèl·lules endotelials expressen molècules d'adhesió com les selectines. Aquestes s'uneixen a altres molècules (tipus mucines), que s'expressen sobre els leucòcits, fent que els leucòcits rodolin per l'endoteli vascular.
2. Les cèl·lules endotelials secreten factors quimioatracients (quimioquines) que s'uneixen als seus receptors, sobre la superfície dels leucòcits, i activen les integrines. Com a resultat es produeix una unió molt estreta entre els leucòcits i cèl·lules endotelials.
3. Les integrines s'uneixen a molècules d'adhesió de la família de les immunoglobulines que s'expressen sobre l'endoteli vascular. Els leucòcits migren a través de les cèl·lules endotelials interactuant amb les molècules d'adhesió.
4. Els leucòcits migren seguint un gradient de quimioquines, el qual es genera per l'alliberació de les mateixes cèl·lules endotelials i macròfags, com a conseqüència del dany produït en el teixit. D'aquesta manera els leucòcits arriben selectivament al lloc on es produeix la inflamació, depenen del tipus de quimioquina que es secreti.

Les proteïnes quimioatracients de monòcits, conegudes com a MCPs [92,93], formen part de la subfamília β , ja que tenen les dues primeres cisteïnes consecutives (C-C). Els gens per aquesta subfamília es troben codificats en el cromosoma 17, que es troba tant en humans com en ratolins, i com el seu nom indica són proteïnes responsables del reclutament de monòcits als diferents llocs d'inflamació. Les MCPs són produïdes/secretades per diversos tipus cel·lulars, que inclouen teixits, leucòcits i cèl·lules tumorals. En general, els principals inductors per l'expressió de les MCPs són les citoquines pro-inflamatòries com és el cas de IL-1, TNF- α o IFN- γ . No obstant, també hi ha altres tipus de citoquines (ex. IL-4, PDGF, etc.) i productes exògens que actuen com a potent inductors de l'expressió d'aquestes (ex. Virus, LPS, etc.).

Hi ha 4 MCPs humanes identificades (MCP1 o CCL2, MCP-2 o CCL8, MCP-3 o CCL7 i MCP-4 o CCL13), les quals tenen menys del 40% de seqüència idèntica amb altres quimiocines C-C.



De les 4 cisteïnes, només 7 residus estan completament conservats en totes les C-C quimiocines, mentre que en les MCPs són 42 els aminoàcids que es troben conservats. En ratolins, també s'han arribat a identificar 4 MCPs (MCP1/JE o CCL2, MCP-2 o CCL8, MCP-3 o CCL7 i MCP-5 o CCL12).

Figura 12. Les quimiocines i els seus receptors. En vermell està indicat on es troba MCP-1 (CCL2) i el seu receptor CCR2. (Figura extreta de l'article *Chemokines: a new class of neuromodulators?*, Röstene et al, Nature Reviews Neuroscience 2007, 8:895-903).

La MCP-1, tant humana com de rosegadors, és una de les MCPs més ben estudiada i caracteritzada. Inicialment, MCP-1 va ser purificada a partir d'una línia de cèl·lules tumorals [94]. S'ha observat que l'expressió de MCP-2 és co-induïble amb l'expressió de MCP-1 en fibroblast i en cèl·lules mononuclears, però també en cèl·lules tumorals. Tot i això, l'expressió de MCP-2 és unes 10 vegades inferior a l'expressió detectada de MCP-1, en aquest tipus cel·lulars [95]. S'ha detectat l'expressió de MCP-3 en cèl·lules endotelials i del tipus Thp-1 [96]. S'ha vist que existeix co-expressió de MCP-3 i MCP-1 en cèl·lules mononuclears, però similar a MCP-2, la producció de MCP-3 és molt menor que l'expressió

de MCP-1. Tant la MCP-4 d'humans com la MCP-5 de rosegadors són les MCPs menys estudiades. L'expressió de MCP-4 s'ha demostrat en cèl·lules epitelials, fibroblast, cèl·lules del múscul llis i cèl·lules mononuclears [97]. En quant a la MCP-5 de rosegadors, s'ha demostrat una estreta homologia amb MCP-1 humana [98].

3. La proteïna quimioattractant de monòcits 1, MCP-1

La proteïna quimioattractant de monòcits 1 (MCP-1 o CCL2), com el seu nom indica és una potent molècula quimioattractant de monòcits/macròfags a les zones d'inflamació, essent clau en la iniciació dels processos inflamatoris. Bàsicament, MCP-1 exerceix la seva funció mitjançant la interacció amb el receptor de membrana CCR2 (Figura 12).

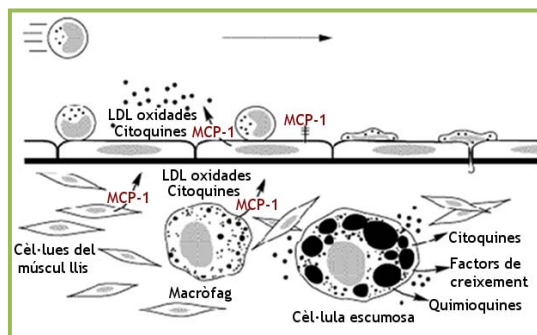
a. Regulació de MCP-1

MCP-1 es troba codificada pel gen *Ccl2*, localitzat en el cromosoma 17 en la posició 17q11 [99]. L'expressió de MCP-1 es troba regulada a nivell de transcripció gènica per agents estimuladors com TNF- α , IFN- γ , PDGF i factors d'estrès. Pel contrari, l'àcid retinoic, els glucocorticoides i els estrògens s'han identificat com inhibidors de l'expressió de MCP-1 [100]. En la majoria d'aquestes respostes trobem una molècula comú, medidora dels diferents processos, el factor nuclear NF- κ B. S'ha vist que NF- κ B també pot ser ràpidament activat per diferents estímuls patològics, tals com TNF- α , IL-1 γ , lipoproteïnes de baixa densitat oxidades (ox-LDL) o inclús per l'expressió d'homocisteïna [101]. Tampoc podem oblidar que la part distal de la regió del promotor de MCP-1 conté dos llocs d'unió NF- κ B, conegudes com κ B-1 i κ B-2, ambdues necessàries per a la regulació de MCP-1 mitjançant TNF. La regió proximal reguladora és suficient per l'expressió induïda de PDGF i IFN- γ i necessària per l'expressió de TNF. Aquesta regió proximal està formada per 3 elements: caixa GC, lloc B i un tercer lloc d'unió per a NF- κ B, el κ B-3. La part referent a la caixa GC està relacionada a molts aspectes referents a la regulació de MCP-1. Pel contrari, tant el lloc B i κ B-3, tot i ser funcionals *in vivo*, encara no s'han pogut relacionar a cap factor.

b. MCP-1 en l'arteriosclerosi

L'arteriosclerosi es considera una malaltia inflamatòria crònica de les artèries que presenta un desenvolupament lent i silenciós, i on intervien múltiples factors genètics i ambientals. De entre totes les proteïnes quimioattractants de monòcits podem dir que en la malaltia arterioscleròtica destaca MCP-1. S'ha vist que la interacció de MCP-1 amb el seu receptor de membrana CCR2, és clau en el reclutament de monòcits a través de la paret

endotelial cap a l'interior del vas sanguini [102]. MCP-1 indueix l'adhesió de monòcits a la paret vascular [103], facilita i promou la diferenciació de monòcits a cèl·lules escumoses



[104], i contribueix a la proliferació de cèl·lules musculars llises [105] (Figura 13).

Figura 13. Paper clau de MCP-1 en l'arteriosclerosi. (Figura adaptada de Charo IF, *Cir Res* 2004, 95: 858-866).

Estudis clínics suggereixen una associació entre la concentració de MCP-1 en plasma i la incidència d'episodis coronaris aguts, la incidència de restenosis després d'una angioplastia, l'arteriosclerosi subclínica o l'arteriosclerosi perifèrica [106-109]. Tanmateix, en un estudi realitzat en pacients infectats pel virus de la immunodeficiència humana (VIH) es demostrava una associació entre nivells elevats de la concentració de MCP-1 en plasma i la presència d'arteriosclerosi subclínica, i que ambdós factors s'associaven concretament a la presència del SNP-2518G de MCP-1 [108], postulant que variacions genètiques en MCP-1 podien tenir importància en l'arteriosclerosi.

La generació d'animals d'experimentació deficientes en MCP-1 o CCR2 (models *knockout*) i en models susceptibles a desenvolupar lesió (el model *MCP-1^{-/-}LDLr^{-/-}*) han demostrat un paper clau d'aquesta proteïna en la iniciació i progressió de la lesió arterioscleròtica. Aquests animals presenten reduccions notables en la mida de la placa de la lesió arterioscleròtica degut a alteracions en l'adhesió leucocitària i la internalització de monòcits i macròfags dins de la paret vascular [110, 111]. Tanmateix, s'ha comprovat com el bloqueig temporal de MCP-1 en models experimentals utilitzats per l'estudi de la lesió arterioscleròtica (model deficient en l'apolipoproteïna E, *ApoE^{-/-}*), contribueix a limitar la progressió de la lesió [112]. De forma inversa, la sobre-expressió de MCP-1 en aquest mateix model experimental (*ApoE^{-/-}*) produeix un augment de la superfície afectada en l'arc aòrtic [113].

c. *L'absència de MCP-1 activa vies alternatives d'inflamació en un model de lesió arterioscleròtica (Annex2)*

Com hem vist en l'apartat anterior, els estudis amb models experimental estableixen un paper clau de la via d'acció MCP-1/CCR2 en l'arteriosclerosi, que s'argumenta en el fet

que la deficiència en MCP-1 o el seu receptor CCR2 contribueixen a una disminució en la migració de monòcits cap a l'íntima. No obstant, l'efecte protector de la deficiència de MCP-1 podria estar regulat per canvis en l'expressió d'altres citocines o quimioquines, en un mecanisme probablement multi-factorial, com es mostra en un estudi amb el model doble *knockout* *MCP-1^{-/-}LDLr^{-/-}* [114, Annex 2]. En aquest estudi, es va considerar que les quimioquines representen un sistema redundat, on la deficiència en MCP-1 podia causar canvis important en l'expressió d'altres citocines o quimioquines com a resposta compensatòria.

Els resultats d'aquest estudi van confirmar el paper protector de MCP-1 en un model susceptible a desenvolupar lesions arterioscleròtiques (*MCP-1^{-/-}LDLr^{-/-}*) en condicions dietètiques normals. No obstant, quan els animals eren alimentats amb una dieta rica en greix i colesterol, per potenciar la presència de placa arterioscleròtica, la resposta no era tan evident. La deficiència en MCP-1 limitava la progressió de la lesió en comparació amb el model control (*LDLr^{-/-}*), però no en prevenia completament la seva presència donat que les lesions observades eren considerables (Figura 14).

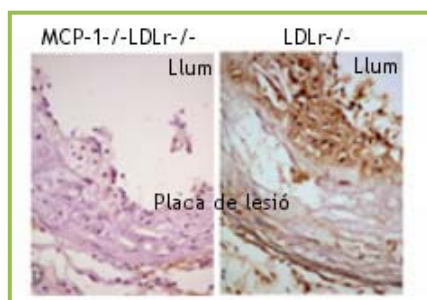


Figura 14. La deficiència de MCP-1 limita la progressió de la placa però no evita la seva presència. Fotografies microscòpiques de les aortes en models alimentats en dieta rica en greix on en color marró es poden veure les cèl·lules tenyides per MCP-1. Figura de Rull A, *Cytokine 2010* [114, Annex 2].

Anàlisis funcionals van ser utilitzats per caracteritzar les vies de senyalització implicades i per identificar els processos biològics involucrats en el desenvolupament i progressió de la lesió arterioscleròtica quan hi havia una deficiència en MCP-1. Les dades suggerien que la lesió arterioscleròtica i la composició de la placa es trobaven associades a les interaccions citocina-citocina. Dels resultats obtinguts es va poder concloure que la deficiència de MCP-1 era compensada amb l'augment considerables d'altres citocines o quimioquines, concretament es va comprovar que la proteïna quimioatracent de monòcits- 5 (MCP-5) actua en el lloc de MCP-1 quan aquesta es troba absent. Així doncs, dels resultats obtinguts vam poder afirmar que hi ha una complexa xarxa d'interaccions entre l'expressió de MCP-1 i l'expressió d'altres citocines i quimioquines (Annex2).

d. Expressió de MCP-1 en teixits i el seu paper general en el metabolisme

MCP-1 es secretada per una gran varietat de tipus cel·lulars que inclouen fibroblasts, cèl·lules endotelials, cèl·lules del múscul llis, cèl·lules epitelials, monòcits, cèl·lules T, i altres tipus cel·lulars que fan d'intermediaris en el pas de les cèl·lules als llocs d'inflamació. Tanmateix, s'ha detectat expressió de MCP-1 en hepatòcits, adipòcits, i illots pancreàtics, i tot plegat fa que molts autors considerin que MCP-1 s'expressa en gairebé tots els teixits (Figura 15) [115-117]. Aquesta distribució tan ubica fa pensar que MCP-1 podria tenir una funció endocrina amb implicació en moltes malalties metabòliques, incloent els desordres metabòlics relacionats amb el metabolisme de la glucosa [118, 119], en particular podria contribuir a les patologies associades amb la hiperinsulinèmia [119]. Tant l'expressió de MCP-1 al teixit adipós com els nivells circulants de proteïna estarien augmentades en l'obesitat i es veurien disminuïdes amb el tractament de tiazolidinediones [120,121]. En un model d'obesitat induïda amb dieta, la deficiència en el receptor de MCP-1 atenua el desenvolupament d'obesitat, acumulació de macròfags al teixit adipós, inflamació en el teixit adipós, i resistència a la insulina sistèmica. El tractament amb antagonistes de CCR2 redueix el contingut de macròfags del teixit adipós i empitjora la sensibilitat de la insulina in vivo [122]. Estudis en animals deficient de MCP-1 suggereixen un paper mínim de MCP-1 en el metabolisme de la glucosa i la sensibilitat a la insulina en ratolins alimentats amb una dieta normal, però que pren protagonisme en la infiltració de macròfags al teixit adipós, la resistència a la insulina i l'esteatosi hepàtica quan aquest animals són tractats amb dietes riques en greix [123].

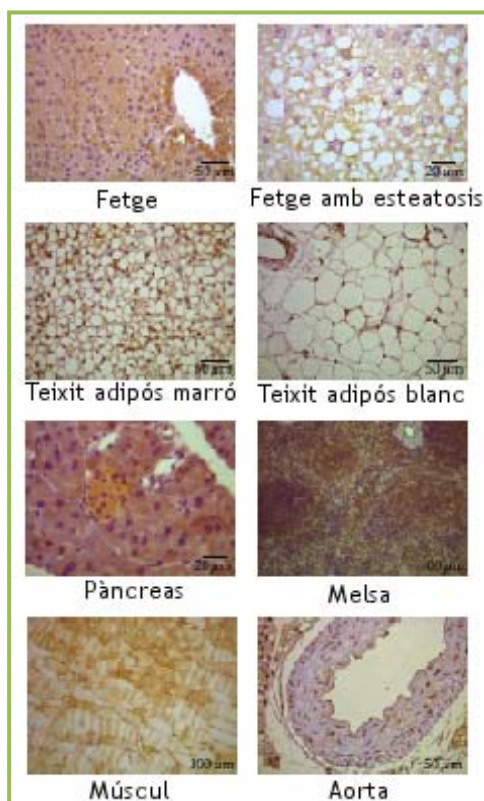


Figura 15. Expressió de MCP-1 en els teixits. Figura de Rull A 2010 [5, Annex 1].

e. MCP-1 i resistència a la insulina en l'obesitat

La peroxidació de lípids i el conseqüent estrès oxidatiu i sobre-expressió de MCP-1 s'ha relacionat recentment amb episodis primerencs d'inflamació al teixit adipós [124-126]. En els processos d'oxidació cel·lular, el 40% de la LDL fosfatidilcolina pot convertir-se en LPC (lysophosphatidylcholine) mitjançant la fosfolipasa A2 associada a LDL [124]. LPC estimula la producció de MCP-1 per un mecanisme que requereix la via de les MEK/ERK tirosina quinasa, i l'activitat PKC [125]. Estudi recents suggereixen que la 12/15-lipoxigenase (12/15LO) es necessària per l'activació de la inflamació en el teixit adipós i la resistència a la insulina en animals tractats amb dietes riques en greix [126]. Les cèl·lules que sobre-expressen 12/15LO segreguen grans quantitats de MCP-1.

f. En l'obesitat, MCP-1 es troba associada a un procés independent a la funció de reclutament de macròfags

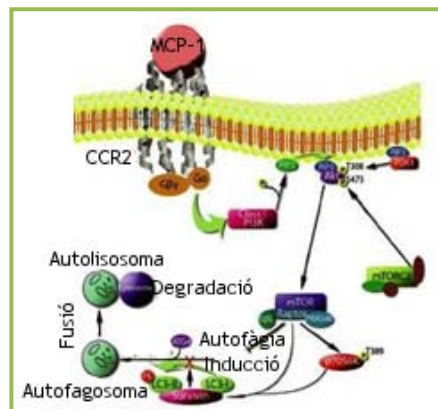
Un estudi recent [127] exposa que la deficiència de MCP-1 no és l'encarregada de disminuir el reclutament de macròfags en l'obesitat i sembla ser que estaria involucrada en desordres metabòlics fins i tot en animals tractats amb dietes pobres en greix. Aquest resultat indicarien un paper independent per MCP-1 en el metabolisme, que dona peu a l'inici de molt estudis. De fet els resultats presentats en L'ESTUDI 1 corroboren aquesta troballa.

g. MCP-1 presenta funcions independents a la quimiotaxi

La quimiotaxi no és l'única funció per MCP-1 [128]. Concentracions elevades de CCL2 indueixen nivells elevats de l'expressió de les xaperones de l'estrès del RE (bàsicament GRP78) que protegirien de la mort cel·lular, segons resultats establerts en estudis de remodelació post-infart [129,130]. Altres estudi suggereixen que MCP-1 està involucrada en l'expressió de metaloproteïnases, en el reclutament de cèl·lules actives en els processos de fibrosis, i en la protecció front l'acumulació de proteïnes de l'estrès oxidatiu [128]. Tanmateix, la interacció MCP-1 amb el receptor de membrana CCR2 indueix l'expressió d'un factor de transcripció inductor de mort cel·lular (MCP-1 induced protein, MCP-1IP) [131]. Aquest factor causa la producció d'espècies reactives d'oxigen (ROS) o de nitrogen, via inducció de NADPH oxidasa i sintasa induïble per NO [132]. Aquest estrès oxidatiu causa estrès del RE que propicia els processos d'autofàgia i mort cel·lular. L'autofàgia és un procés catabòlic mitjançant el qual el material macromolecular (com les proteïnes) i els òrgans cel·lulars són absorbits dins de vesícules citoplasmàtiques de doble membrana cel·lular (autofagosomes), per a ser degradats i reciclats per a la generació de substrats metabòlics via fusió amb els lisosomes. D'aquesta forma es fa

plausible l'interessant interacció entre MCP-1 i mort cel·lular i els processos d'autofàgia en un complex programa de progressió tumoral (Figura 16) [133].

Figura 16. Relació de MCP-1 i autofàgia. Un estudi recent proposava un mecanisme pel qual MCP-1 controlaria la mort cel·lular en el càncer de pròstata (Figura adaptada de Roca H, *Autophagy* 2008; 4:969-71).



h. El receptor CCR2 no és l'únic receptor per MCP-1: Influència de les variacions genètiques en les concentracions de MCP-1 circulant

Tot i que el receptor més reconegut per MCP-1 en teixits és CCR2 [134], s'ha vist que hi ha una altre molècula anomenada DARC (*Duffy antigen receptor for chemokines*) que pot estar implicada en la interacció de MCP-1 en els eritròcits i les cèl·lules endotelials [135]. Degut a la seva estructura, DARC no és pot acoblar a proteïnes G i per això s'ha agrupat en una família de 2 molècules heptahèlix, D6 i CCX-CKR, per formar part d'una família de receptors de quimioquines silencioses atípiques [136]. Tanmateix s'ha comprovat que DARC no pot actuar com a atraient però si pot recolzar l'activitat de les quimioquines i és requerida per una òptima migració quimiotàctica de leucòcits *in vivo* i *in vitro* [137]. Són diversos els polimorfismes (SNPs) de MCP-1 que s'han trobat associats a concentracions circulants de MCP-1 [138]. Recentment, s'ha realitzat un estudi d'associació genòmica en tres poblacions diferents per identificar les bases genètiques de les concentracions en circulació de MCP-1. S'ha vist que l'associació més evident es la trobada entre les nivells de MCP-1 en sèrum i un polimorfisme no sinònim de DARC (rs12075) [139].

i. MCP-1, diana terapèutica

En un estudi recent amb animals d'experimentació s'han examinat els efectes d'un increment en les concentracions de MCP-1 en la circulació degut a l'administració de MCP-1 recombinant a curt i llarg termini [140]. Un increment crònic dels nivells de MCP-1 indueixen resistència a la insulina, infiltració de macròfags al teixit adipós, i un increment del contingut de triacilglicerol hepàtic. S'ha comprovat que un increment agut també induïa resistència a la insulina, present en aquests animals sense infiltració de macròfags

en el teixit adipós. Per altra banda, es va veure que l'administració d'un antagonista de CCR2 podia millorar la resistència a la insulina de ratolins tractats amb dieta rica en greix sense que la infiltració de macròfags en el teixit adipós es trobes afectada. Tots aquest resultats en conjunt indiquen que un increment en les concentracions circulants de MCP-1 són suficients per induir resistència a la insulina sistèmica no depenen de la inflamació del teixit adipós i suggereixen que MCP-1 pot ser un efector en la regulació del metabolisme. Per tant, es concebible que noves estratègies terapèutiques podrien passar per un bloqueig del receptor de les quimioquines amb antagonistes específics. Estudis amb animals han demostrat un reducció efectiva en la formació de la lesió en les artèries coronaries i en *stents* experimentals de estenosis [141,142]. Sorprenentment, aquests bloquejadors no han estat encara testats per al tractament de complicacions metabòliques, tot i que si podem trobar-ne alguna referència [143]. No obstant això, hem de tenir en compte que l'ús d'aquests agents en humans és qüestionable donat que no sabem quin efecte podria tenir la supressió de MCP-1, i si podria ser perillós per la seguretat humana. El que si podria ser una opció seria la disminució de MCP-1 amb l'ús de flavonoides derivats de plantes i la seva acció sobre la via CCL2-CCR2. L'ús de petites molècules, encara sota investigació per la seguretat i l'eficiència, obre noves vies d'exploració on els estudis han estat plantejats sota la hipòtesis que algunes complicacions metabòliques podrien ser mitigades mitjançant la modulació de l'expressió de MCP-1 [144,145].

RESUM DEL CAPÍTOL

- ✓ En l'obesitat i malalties associades (resistència a la insulina, diabetis tipus 2, esteatosis hepàtica, malalties cardiovasculars) la presència d'inflamació sistèmica està associada a un defecte en el balanç del sistema immune, on les quimioquines juguen un paper clau.
- ✓ Les quimioquines actuen com a mediadors inflamatoris que s'encarreguen de desencadenar una resposta d'estrès cel·lular en els teixits produint una resposta general que no és limitada a efectes locals però que si pot estar associada a la generació de respostes múltiples.
- ✓ Tradicionalment, MCP-1 era reconeguda per la seva implicació en la regulació de monòcits, macròfags i altres cèl·lules inflamatòries en la formació de la lesió arterioscleròtica. Actualment s'ha postulat un paper fonamental per MCP-1 en diversos desordres metabòlics.
- ✓ El gen de MCP-1 estaria involucrat en la resposta de la insulina, disminuint la captació de glucosa per l'acció de la insulina i incrementant en l'expressió de gens adipogènics.
- ✓ L'anàlisi d'expressió de MCP-1 amb tècniques immunohistoquímiques mostra una expressió ubiqua d'aquesta molècula, suggerint-ne una funció endocrina similar a l'acció de les hormones, que explicaria la importància de MCP-1 en múltiples processos biològics i el seu paper en la inflamació.
- ✓ Hi ha una complexa xarxa d'interaccions entre MCP-1 i altres citoquines i quimioquines, de manera que l'absència de MCP-1 queda compensada amb l'augment de l'expressió d'altres molècules, com MCP-5.
- ✓ Tot i que el receptor més reconegut per MCP-1 en teixits és CCR2, s'ha vist que MCP-1 també pot interactuar amb una altra molècula anomenada DARC, de la família de receptors de quimioquines silencioses atípiques.
- ✓ La disminució de MCP-1 amb l'ús de flavonoides derivats de plantes podria plantejar-se com una mesura terapèutica.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLAMACIÓ COM A NEXE D'UNIÓ ENTRE OBESITAT I COMPLICACIONS METABÒLIQUES: ESTEATOSI
HEPÀTICA.

Anna Rull Aixa
DL: T-1516-2011

PAPER DELS MODELS ANIMALS EN L'ESTUDI DEL METABOLISME

1. Introducció

La cerca de les bases moleculars implicades en les alteracions metabòliques depenen de la disponibilitat de models experimentals que comparteixin similituds fisiològiques, anatòmiques i metabòliques amb els humans. Un dels models animal més comunament utilitzat per l'estudi malalties metabòliques és el ratolí (*Mus Musculus*), ja que presenta l'avantatge de poder ser manipulat genèticament amb precisió, representa un cost relativament baix en comparació amb altres models animals d'experimentació, i ofereix la possibilitat de poder controlar els factors ambientals que poden influir en la progressió de la malaltia que es vol estudiar [146].



Figura 17. El ratolí és un dels models animals més utilitzat en l'estudi de desordres metabòlics.

No obstant, no podem oblidar que el fet de treball amb animals d'experimentació requereix unes consideracions ètiques importants i que comencen amb el disseny del projecte. L'experimentació amb animals està regulada amb el principi de les 3Rs: *Reaplace, Reduce & Refine*. Aquest principi va ser creat com a mesura alternativa a l'ús d'animals d'experimentació, i es basa en el concepte de 1) reemplaçar l'ús d'animals d'experimentació quan sigui prescindible per altres vies d'estudi, 2) reduir al màxim el nombre d'animals per projecte i 3) refinar el mètode de treball existent per disminuir el dolor i malestar dels animals. El seguiment d'aquest principi s'aconsegueix amb la creació de comitès ètics d'experimentació animal, integrats per diferents estaments socials que valoren les hipòtesis i els protocols de treball proposats pels investigadors.

2. Models d'esteatosi i inflamació hepàtica

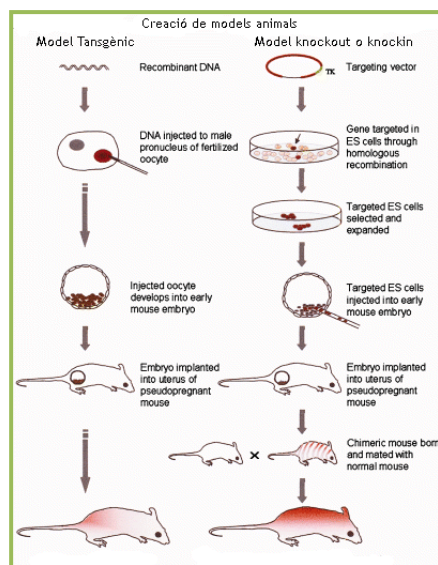
L'elevat nombre d'estudis amb animals d'experimentació en ha proporcionat les bases fonamentals per entendre la complexitat molecular que envolta la iniciació i la progressió de l'esteatosi i la inflamació hepàtica, tot i que són molts els enigmes que encara resten per resoldre [147,148]. Els models d'esteatosi i inflamació hepàtica poden dividir-se bàsicament en dos categories, 1) aquells models que presenten esteatosi i/o inflamació de forma espontània o induïda per mutació genètica, o bé 2) aquells models que adquireixen l'esteatosi per manipulació dietètica o farmacològica. L'excés de nutrients, una condició habitual en la nostra societat, predisposa al desenvolupament de sobrepès, obesitat, resistència a la insulina i esteatosi hepàtica. Els animals que són exposats a una excés calòric, amb dietes riques en greix, acaben mostrant complicacions metabòliques similars a les observades amb els humans. Una de les avantatges que ens proporciona l'ús d'animals d'experimentació és la combinació d'ambdós models, la possibilitat de combinar la manipulació genètica i dietètica en el mateix model, i que ens proporciona condicions d'estudi diverses i estables (Annex 3).

3. Manipulació genètica per la creació de models experimentals

La generació de nous animals d'experimentació facilita l'estudi de condicions específiques que es troben en la patologia humana i es basa en la creació de models per tècniques de manipulació genètica (Figura 18):

- a) Models *Knockout* i *Knockin*, són models amb una mutació dirigida basada en l'eliminació (*knockout*) o la inserció (*knockin*) d'un gen d'interès. La modificació genètica es construeix en un vector que conté una regió selectiva resistent a un determinat fàrmac i una regió homòloga.

Figura 18. Esquema il·lustratiu de la creació de models animals modificats genèticament. Figura extreta de Chen J, Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings 2005; 10, 37-46.



La tècnica consisteix en transferir aquest vector, per electroporació, a un cultiu de cèl·lules embrionàries (*Stem Cells*) i posteriorment escollir les que han estat correctament transferides per la identificació selectiva d'antibiòtics. Les cèl·lules que han estat correctament transferides són inoculades a blastòcits que seran trasplantats a l'úter de femelles pseudoprenyades. Aquests tipus de models s'utilitzen bàsicament per estudiar el paper fonamental d'un determinat gen. Actualment, és molt comú trobar estudis en animals que són doble *knockout*, és a dir, models en els que s'ha produït una doble mutació.

- b) Models *Transgènics*, són models que contenen un segment de DNA recombinant portador d'informació genètica específica. Un cop creat, el DNA exogen és injectat en el pronucli d'un oòcit fertilitzat. EL DNA recombinant és ràpidament introduït en el genoma de l'oòcit, que desenvolupa en un embrió de ratolí. L'embrió es trasplantat a l'úter d'una femella pseudoprenyada i l'animal que es desenvolupa a partir d'aquest embrió és un model transgènic.

4. La soca C57BL/6J

La soca de ratolí triada per la generació de nous models animals és molt important, ja que conjuntament amb els factors ambientals, serà un dels contribuïdors més rellevant en la variabilitat fenotípica dels resultats que s'obtidran [149]. De fet cada soca presenta una susceptibilitat diferent a desenvolupar anormalitats bioquímiques i metabòliques, que poden ser determinants per l'estudi d'una patologia concreta. La soca C57BL/6J és la soca més utilitzada per la creació de nous models animals i això fa que sigui comercialment molt assequible. Aquest model quan és alimentat amb una dieta aterogènica (quantitats elevades de lípids i glucosa) és susceptible a l'obesitat induïda per la dieta, a la diabetis tipus 2, i l'arteriosclerosi. El model C57BL/6J es freqüentment utilitzat com a control i soca base en una gran varietat de projectes amb models experimentals modificats genèticament per l'estudi de l'obesitat i malalties associades, arteriosclerosi i/o esteatosis hepàtica [146,149].

5. Ratolí deficient en el receptor de les LDL ($LDLr^{-/-}$)

EL receptor de les lipoproteïnes de baixa densitat (LDLr) té un paper clau en la regulació del metabolisme del colesterol. El receptor de les LDL s'encarrega de regular la captació de lipoproteïnes a l'interior cel·lular per garantir la necessitat de la creació de

membranes cel·lulars i la síntesi de salts biliars, promovent a la vegada una reducció de la concentració de colesterol i lipoproteïnes que circulen pel plasma. El receptor de les LDL s'encarrega de la captació de les lipoproteïnes de baixa densitat (LDL) i de densitat intermèdia (IDL) que es troben a la circulació, pel reconeixement de les apolipoproteïnes B i E (ApoE i ApoB) que es troben al voltant de les partícules de LDL i IDL. Tot i que el receptor de les LDL es troba en un gran nombre de teixits i cèl·lules, el fetge és el principal òrgan on es produeix aquesta captació i per conseqüent l'eliminació de les lipoproteïnes que es troben a la circulació.

El model experimental deficient en el receptor de les LDL (LDLR^{-/-}) és un model que ha estat tradicionalment utilitzat en l'estudi de l'arteriosclerosi per la facilitat de formar plaques de lesió arterioscleròtica considerables quan són alimentats amb dietes riques en greix i colesterol [150]. De fet, aquest model (en la soca C57BL/6J) en condicions on l'alimentació és normal ja presenta concentracions plasmàtiques de colesterol que són el doble que el model C57BL/6J, i la ingesta de greix i colesterol en la dieta potencia l'aparició d'obesitat i complicacions metabòliques associades com resistència a la insulina o esteatosis hepàtica [150, Annex 2 i 3].

RESUM DEL CAPÍTOL

- ✓ La disponibilitat de models experimentals que comparteixin similituds fisiològiques, anatòmiques i metabòliques amb els humans ens facilita la cerca de les bases moleculars implicades en les alteracions metabòliques.
- ✓ L'ús d'animals d'experimentació requereix unes consideracions ètiques importants abans de considerar qualsevol estudi viable.
- ✓ La generació de models animals d'experimentació a partir de tècniques de manipulació genètica facilita l'estudi de condicions específiques que es troben en la patologia humana.
- ✓ El model experimental deficient en el receptor de les LDL (LDLR^{-/-}) és un model viable per l'estudi de l'obesitat i les malalties associades, resistència a la insulina, arteriosclerosi o esteatosis hepàtica. I per tant pot servir com a base per la creació de models doble *knockout*, que ajudaran a determinar la implicació d'un gen o d'una molècula en tots aquest processos.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLAMACIÓ COM A NEXE D'UNIÓ ENTRE OBESITAT I COMPLICACIONS METABÒLIQUES: ESTEATOSI
HEPÀTICA.

Anna Rull Aixa
DL: T-1516-2011

II *HIPÒTESI i OBJECTIUS*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLAMACIÓ COM A NEXE D'UNIÓ ENTRE OBESITAT I COMPLICACIONS METABÒLIQUES: ESTEATOSI
HEPÀTICA.

Anna Rull Aixa
DL: T-1516-2011

HIPÒTESI I OBJECTIUS

1. *Hipòtesi*

En l'obesitat, l'estrès metabòlic produït per un excés de nutrients activa la secreció de molècules dels processos inflamatoris que seran les detonants de l'activació de vies de senyalització metabòliques implicades en la progressió i manteniment de l'obesitat i les patologies associades, com l'esteatosi hepàtica. Una d'aquestes molècules podria ser la proteïna quimioatracent de monòcits-1 (MCP-1). Creiem que MCP-1 pot tenir un paper que va més enllà del reclutament de monòcits a la lesió arterioscleròtica. I per tant, creiem que:

- ✓ La proteïna quimioatracent de monòcits-1 (MCP-1) intervé no solament en la inflamació sinó també en la homeòstasi metabòlica

2. *Objectius*

- ✓ Estudiar el paper de la inflamació en les complicacions metabòliques: Avaluació de l'absència de MCP-1 en ratolins deficient en el receptor de la lipoproteïna de baixa densitat (ratolins LDLr^{-/-})
- ✓ Explorar el paper de MCP-1 en la iniciació i la progressió de l'esteatosi hepàtica en el model LDLr^{-/-}
- ✓ Identificar les vies metabòliques implicades en l'esteatosi hepàtica: Estudi dels canvis metabolòmics en el teixit hepàtic

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLAMACIÓ COM A NEXE D'UNIÓ ENTRE OBESITAT I COMPLICACIONS METABÒLIQUES: ESTEATOSI
HEPÀTICA.

Anna Rull Aixa
DL: T-1516-2011

III *RESULTATS*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLAMACIÓ COM A NEXE D'UNIÓ ENTRE OBESITAT I COMPLICACIONS METABÒLIQUES: ESTEATOSI
HEPÀTICA.

Anna Rull Aixa
DL: T-1516-2011

ESTUDI 1

Deficiency in monocyte chemoattractant protein-1 modifies lipid and glucose metabolism

Experimental and Molecular Pathology 83 (2007) 361-366

BREU RESUM

Per explorar la influència de la inflamació en les complicacions metabòliques, vam dissenyar aquest estudi que avalua l'efecte de la deficiència de la proteïna quimioattractant de monòcits-1 (MCP-1) en ratolins que presenten hiperlipèmia per la supressió del receptor de les LDL. Es van utilitzar ratolins deficients en el receptor de les LDL (LDLr^{-/-}) (*Jackson Laboratory*) i ratolins deficients tant en el receptor de les LDL i la proteïna quimioattractant de monòcits-1 (MCP-1^{-/-}LDLr^{-/-}) (*Dana-Farber Cancer Institute*) de 11-12 setmanes d'edat, alimentats amb una dieta estàndard de manteniment (n= 10-12 per grup d'estudi). Per altra banda, i basant-nos en els resultats obtinguts, és va fer un grup addicional d'estudi per comprovar si hi havia un possible efecte en resposta a una dieta rica en greix i colesterol. Es va utilitzar un grup addicional de ratolins per cada soca (n= 8 per grup). Aquest animals van rebre durant 22 setmanes una dieta comercial rica en greix (20% oli de palma) amb suplement extra de colesterol (0.25% w/w).

Els resultats obtinguts mostraven que tot i presentar una aparença fenotípica idèntica i similitud en quant al pes a les 11-12 setmanes d'edat, el model MCP-1^{-/-}LDLr^{-/-} presentava una disminució en l'aclariment de les lipoproteïnes, menor tolerància a la glucosa i empitjorament en el metabolisme dels àcids grassos, quan el comparàvem amb el model LDLr^{-/-} en condicions dietètiques normals. Tot i que ambdós models presentaven hiperlipèmia, el model MCP-1^{-/-}LDLr^{-/-} mostrava nivells més elevats de triglicèrids i colesterol, indicant un possible paper de MCP-1 en el metabolisme dels lípids. De fet, vam poder comprovar com la deficiència de MCP-1^{-/-} produïa una disminució del catabolisme de les VLDL quan era comparat amb el model LDLr^{-/-}. Tanmateix, el model MCP-1^{-/-}LDLr^{-/-} presentava un increment en el nivells circulants d'àcids grassos, un fenomen associat a la resistència a la insulina perifèrica, que causa una disminució en la captació d'àcids grassos en el teixit adipós i que promou un increment d'àcids grassos a la circulació, en un cercle viciós. Així doncs, en aquest punt de l'estudi vam concloure que hi havia una connexió entre els problemes observats en quant a l'aclariment de proteïnes i el metabolisme de la glucosa, que va ser corroborat al comprovar que hi havia un increment de la concentració

de glucosa en plasma en el model MCP-1^{-/-}LDLr^{-/-}, així com una menor i més lenta resposta a l'aclariment de glucosa ingerida.

En l'estudi addicional amb animals alimentats amb dietes riques en greix vam poder observar que el model MCP-1^{-/-}LDLr^{-/-} presentava una certa resistència a desenvolupar obesitat induïda per una dieta rica en greix i colesterol, acompanyada d'una resistència parcial a les alteracions del metabolisme de la glucosa i dels lípids. Aquest resultat indicaven que la hiperlipèmia, un factor molt comú en l'obesitat i la síndrome metabòlica podia resultar un factor confús, i que l'absència de MCP-1 en certes condicions podia resultar tan perjudicial com una sobre-expressió de la proteïna. Les nostres conclusions van ser clares, 1) MCP-1 estava implicada no només en la inflamació sinó també en l'homeòstasi metabòlica i 2) Per a un metabolisme controlat es necessita una quantitat justa de MCP-1 i per tant MCP-1 podria ser considerada com a diana terapèutica.

Així doncs, vam considerar important esbrinar els efectes de MCP-1 en un òrgan clau en el control de l'homeòstasi metabòlica de l'organisme, el fetge. La idea era explorar el paper de MCP-1 en la iniciació i la progressió de l'esteatosi hepàtica en el model LDLr^{-/-}. En aquest primer treball s'havien avaluat els efectes que tenia l'absència de MCP-1, i per tant era necessari primer esbrinar que passava en el model LDLr^{-/-} en condicions on l'expressió de MCP-1 no estava restringida genèticament (Estudi 2).



Deficiency in monocyte chemoattractant protein-1 modifies lipid and glucose metabolism

Anna Rull^a, Joan Carles Escolà-Gil^b, Josep Julve^b, Noemí Rotllan^b, Laura Calpe-Berdiel^b,
Blai Coll^a, Gerard Aragonès^a, Judit Marsillach^a, Carlos Alonso-Villaverde^a,
Jordi Camps^a, Francisco Blanco-Vaca^b, Jorge Joven^{a,*}

^a Centre de Recerca Biomèdica, Institut de Recerca en Ciències de la Salut (IRCS), Hospital Universitari de Sant Joan, C/ Sant Joan s/n, 43201-Reus, Spain

^b Servei de Bioquímica, Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, C/ Antoni M Claret, 167, 08025 Barcelona, Spain

Received 14 March 2007, and in revised form 31 July 2007

Available online 31 August 2007

Abstract

We describe the effect of MCP-1 deficiency in mice rendered hyperlipemic by the concomitant ablation of the LDL receptor. The MCP-1^{-/-}LDLr^{-/-} mice in comparison with LDLr^{-/-} mice showed a decreased lipoprotein clearance, derangements in free fatty acids delivery and less glucose tolerance when fed a regular chow, and they showed a partial resistance to alterations in glucose and lipid metabolism induced by dietary fat and cholesterol. They also were less prone to the development of diet-induced obesity. Our results suggest that the role of MCP-1 in metabolism is relevant and that, although new hidden complexities are evident, the function of MCP-1/CCL2 extends far beyond the monocyte chemoattractant effect. Therefore, the regulatory mechanisms influenced by MCP-1 should be fully ascertained to understand the metabolic consequences of inflammation and before considering MCP-1 as a therapeutic target.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Hyperlipidemia; Inflammation; Insulin resistance; LDLr deficiency; Monocyte chemoattractant protein-1; MCP-1; Obesity

Introduction

The secretion of chemokines and the activation of their receptors are important factors in inflammation (Luster, 1998) and consequently in atherosclerosis. The chemokine monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1, also called CCL2), through the activation of its receptor (CCR2), promotes the adhesion of blood circulating monocytes across the endothelium, participates in their recruitment into the subendothelium space and contributes to the differentiation of macrophages to foam cells (Steinberg and Lewis, 1997; Cushing et al., 1990). All these effects are critical steps in atherogenesis (Tous et al., 2006a; Nelken et al., 1991), and the selective absence of either MCP-1 (Gu et al., 1998) or CCR2 (Boring et al., 1998) significantly decreases the atherosclerotic lesion formation.

Some findings suggest that the function of MCP-1/CCL2 extends far beyond the monocyte chemoattractant effect (Inouye

et al., 2007). Some results suggest that the reduced adipose tissue macrophages in obese MCP-1 and CCR2-deficient mice and a concomitant improvement in insulin resistance may be causally related (Kanda et al., 2006; Weisberg et al., 2006). This is not completely sustained by results obtained in CCR2-deficient mice fed a high-fat diet (Chen et al., 2005). Further, it has been recently (Inouye et al., 2007) reported that the absence of MCP-1 does not limit obesity-associated infiltration of macrophages into adipose tissue.

To further assess the putative role of MCP-1 in metabolism, we have extended our studies in an MCP-1-deficient model rendered hyperlipemic by the ablation of low density lipoprotein receptor (MCP-1^{-/-}LDLr^{-/-} double knockout).

Materials and methods

Experimental animals

We studied male LDLr^{-/-} mice, MCP-1^{-/-} mice and wild-type mice with the same genetic background (C57BL/6J), obtained by inbreeding of animals purchased from the Jackson Laboratory. The MCP-1^{-/-}LDLr^{-/-} mice used in

* Corresponding author. Fax: +34 977 312569.

E-mail address: jjoven@gnpsagessa.com (J. Joven).

this study were the progeny of mice kindly provided by B.J. Rollins, from the Dana-Farber Cancer Institute, from which details have been already described (Boring et al., 1998). They were housed under standard conditions and given a commercial mouse diet (14% protein rodent maintenance diet, 0.03% cholesterol, Harlan) and water ad libitum until experiments began. The littermates for each model were equally maintained and randomly assigned to the different procedures. All mice were fasted for 13 h and had similar ages (11–12 weeks) when measurements were performed (unless otherwise stated, $n=10-12$ each). In search of a possible effect of dietary fat, additional LDLr^{-/-} mice and MCP-1^{-/-} LDLr^{-/-} mice were randomly assigned to two dietary groups ($n=8$ each); one was fed with regular chow and the other with chow supplemented with palm oil (20% fat w/w) and 0.25% (w/w) cholesterol. The dietary experiment lasted for 22 weeks. All procedures were conducted in conformity with the policies of the ethical committee of the Universitat Rovira i Virgili.

Sample collection and laboratory measurements

When necessary, plasma was obtained from the tail of anesthetized animals. Blood was also obtained at the moment of sacrifice and collected into tubes containing EDTA. The relevant tissues were removed, flash-frozen and stored at -80°C until further analysis. Plasma leptin and TNF α concentration were measured by ELISA (DSL, Texas, USA and eBioscience, San Diego, CA, USA, respectively). Plasma glucose, cholesterol, triglycerides, phospholipids and free fatty acids (FFA) concentrations were determined with commercial kits, as described (Escola-Gil et al., 2000). Plasma lipoproteins were separated using a Superose 6HR gel FPLC column and each fraction assayed for total cholesterol and triglycerides (Vilella et al., 1993). Liver lipids were extracted and measured as described (Escola-Gil et al., 2000).

In vivo VLDL metabolism

To assess the triglyceride production rates, we measured the accumulation of triglycerides in plasma prior to and after the injection of Triton WR-1339 (Sigma) as described (Julve et al., 2000). The very low density protein (VLDL) fraction isolated by ultracentrifugation from each type of mouse was radiolabeled with [³H] triolein and then injected in fasted mice as described (Escola-Gil et al., 2000). Serial blood samples were collected for [³H] counting and the amount of radioactivity in the selected tissues was performed as described (Escola-Gil et al., 2000).

Lipoprotein lipase activity

LPL activity was measured using a described radiolabeled emulsion and method (Ribas et al., 2005). Fasted mice were injected intraperitoneally with 500 U/kg of heparin (Rovi, Madrid, Spain) and plasma was collected 30 min later (postheparin plasma LPL). LPL was also determined in the gastrocnemius muscle and epididymal white adipose tissue (WAT). Tissues were homogenized at 4 °C in appropriate buffer and centrifuged at 10,000 rpm for 10 min to obtain the supernatants on which to measure LPL activity (Julve et al., 1996).

Glucose, insulin and oral fat tolerance tests

Glucose concentrations in tail blood were measured with test glucose strips (Roche Diagnostics). Plasma insulin concentrations were measured using a radioimmunoassay (Linco, St. Charles, MO). The glucose tolerance tests were performed by intraperitoneal administration of glucose (2 mg/g of body weight) and measurement of blood glucose at $t=0, 15, 30, 60$ and 120 min in anesthetized mice. The insulin tolerance tests were performed similarly, by intraperitoneal administration of porcine insulin at a dose of 0.6 IU/Kg and blood glucose measured prior to and 15, 30, 60 and 120 min after the insulin injection (Tous et al., 2006b). For the oral tolerance tests, anesthetized mice were given an intragastric bolus of 150 μ l of olive oil and blood triglycerides determined with test strips (Roche Diagnostics) at $t=0, 1.5, 3, 5, 7$ and 10 h.

Table 1

Plasma and liver concentration of selected variables in LDLr^{-/-} mice and MCP-1^{-/-}LDLr^{-/-} mice as measured in fasted (13 h) male 11-week-old mice

	Plasma (mmol/L)		Liver (μ mol/g)	
	LDLr ^{-/-}	MCP-1 ^{-/-} LDLr ^{-/-}	LDLr ^{-/-}	MCP-1 ^{-/-} LDLr ^{-/-}
Cholesterol	5.43 \pm 0.57	10.15 \pm 0.50**	1.87 \pm 0.25	2.59 \pm 0.20*
Triglycerides	0.78 \pm 0.77	1.78 \pm 0.11*	1.09 \pm 0.10	1.88 \pm 0.21*
Phospholipids	4.12 \pm 0.16	6.18 \pm 0.30**	7.54 \pm 0.83	10.72 \pm 0.66*
Free	1.60 \pm 0.60	2.71 \pm 0.54**	ND	ND
Cholesterol				
Free fatty acids	0.40 \pm 0.06	0.98 \pm 0.21*	ND	ND
Glucose	4.56 \pm 0.15	6.86 \pm 0.19*	ND	ND
Insulin (ng/ml)	0.78 \pm 0.06	0.80 \pm 0.05	ND	ND

Data are shown as mean \pm SEM of 10 male mice per group. * $p<0.05$ and ** $p<0.001$ vs. LDLr^{-/-} mice. ND: not determined.

Histology

In selected samples, microscopic examination was performed on the epididymal adipose tissue. Tissues were removed, fixed for 24 h in 10% neutral-buffer formalin, processed and embedded in paraffin. The area of adipocytes was quantified using AnaliSYS (Soft Imaging System, Munster, Germany). Sections were stained with F4/80 (rat anti-mouse macrophages/monocytes; Serotec, Oxford, UK). Images were acquired, and results were analyzed as a fraction of nuclei of F4/80 expressing cells divided by the total number of nuclei.

Statistical analyses

Values are expressed in means \pm SEM. Data were compared using either ANOVA or the unpaired Student's t -test. GraphPad Prism 4.0 software (GraphPad, San Diego, CA) was used to perform all statistical analyses. A P value <0.05 was considered statistically significant.

Results and discussion

LDLr^{-/-} and MCP-1^{-/-} LDLr^{-/-} mice had identical apparent phenotypes and similar body weight at 11–12 weeks of age (21.08 \pm 0.87 g and 21.53 \pm 0.68 g, respectively). Both strains were hyperlipemic but the MCP-1^{-/-}LDLr^{-/-} mice showed higher plasma cholesterol and triglycerides (Table 1) indicating a possible role of MCP-1 in lipid metabolism. The higher hypercholesterolemia in double KO mice was due to a higher enrichment of cholesterol in all lipoproteins (Fig. 1A) and the excess in plasma triglycerides to a selective accumulation in triglyceride-rich lipoproteins (Fig. 1B). To further assess the effect of MCP-1 deficiency in hyperlipidemia, we measured plasma lipid levels in MCP-1^{-/-} mice as compared with wild-type mice and we found similar but lower ($p<0.05$) plasma cholesterol concentration (1.58 \pm 0.08 mmol/L vs. 1.95 \pm 0.03 mmol/L) and lower plasma triglyceride concentration (0.22 \pm 0.07 mmol/L vs. 0.31 \pm 0.03 mmol/L). Therefore, in normal conditions, at this age and body weight, the deficiency in MCP-1 seems not to have substantial effects in the maintenance of plasma lipid levels but, in a hyperlipidemic state, the loss of MCP-1 seems to alter plasma lipid concentrations. Subsequent analyses were focused on triglyceride metabolism in hyperlipidemic mice.

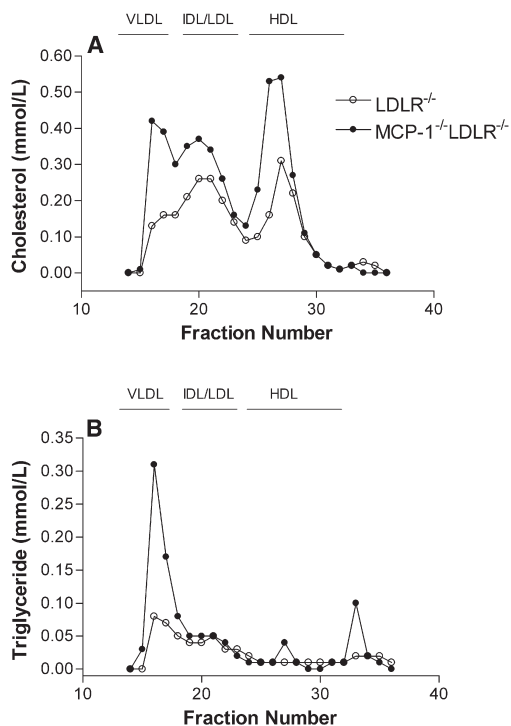


Fig. 1. FPLC fractionation of fasting plasma lipids from LDLr^{-/-} and MCP-1^{-/-}LDLr^{-/-} mice 11–12 weeks of age maintained in a regular chow diet indicating an excess of cholesterol and triglycerides in the double KO mice. Plasma samples were pooled and fractions were collected and assayed for cholesterol (A) and triglycerides (B). The elution of the VLDL, IDL/LDL and HDL fractions is indicated.

The balance in plasma lipid levels is determined by their production, their clearance or a combination of both factors. No differences were found between MCP-1^{-/-}LDLr^{-/-} and LDLr^{-/-} mice when we explored the accumulation of triglycerides in the fasting plasma of mice after the intravenous injection of Triton WR-1339, which completely blocks plasma triglyceride clearance (Fig. 2A). Therefore, increased production is not likely. However, the MCP-1^{-/-}LDLr^{-/-} mice showed a trend towards a decreased *in vivo* VLDL catabolism compared with the LDLr^{-/-} mice (Fig. 2B). There were no differences between models in the tissue content of [³H] triolein in adipose tissue (0.15±0.05% of injected dose in LDLr^{-/-} mice and 0.16±0.02% in MCP-1^{-/-}LDLr^{-/-} mice) but we observed an increased amount of [³H] triolein in the heart (1.48±0.01% of injected dose) and liver (p<0.05) (6.46±0.23% of MCP-1^{-/-}LDLr^{-/-} mice with respect to LDLr^{-/-} mice (0.32±0.05% and 2.47±0.50% respectively). As expected, we found a significant increase in the hepatic lipid concentration of MCP-1^{-/-}LDLr^{-/-} mice (Table 1) although the liver weight (0.83±0.02 g) was lower (p<0.05) than that of LDLr^{-/-} mice (1.09±0.05 g). Finally, we also found significantly (p<0.05) higher plasma FFA levels and an abnormal postprandial response to an oral fat overload in MCP-1^{-/-}LDLr^{-/-}

mice (Table 1 and Fig. 2C). All these findings suggest that there is not an increased lipoprotein production and that the putative defect in plasma lipid clearance may be exacerbated by dietary fat. To further assess the possible defective lipoprotein clearance, we explored LPL activity in plasma and selected tissues. We did not find differences in the postheparin plasma LPL activity (92.5±22.46 mU/ml in LDLr^{-/-} mice and 127.70±20.66 mU/ml in MCP-1^{-/-}LDLr^{-/-} mice) nor in the gastrocnemius muscle LPL activity (28.61±2.38 mU/g tissue in LDLr^{-/-} mice and 25.58±2.13 mU/g tissue in MCP-1^{-/-}LDLr^{-/-} mice). However, the LPL activity of the epididymal fat pad was significantly (p=0.0159) reduced in MCP-1^{-/-}LDLr^{-/-} mice (10.59±1.02 mU/g tissue) with respect to LDLr^{-/-} mice (17.59±7.84 mU/g tissue). This selective reduction of LPL activity in adipose tissue may be relevant because although the physiological pathways by which

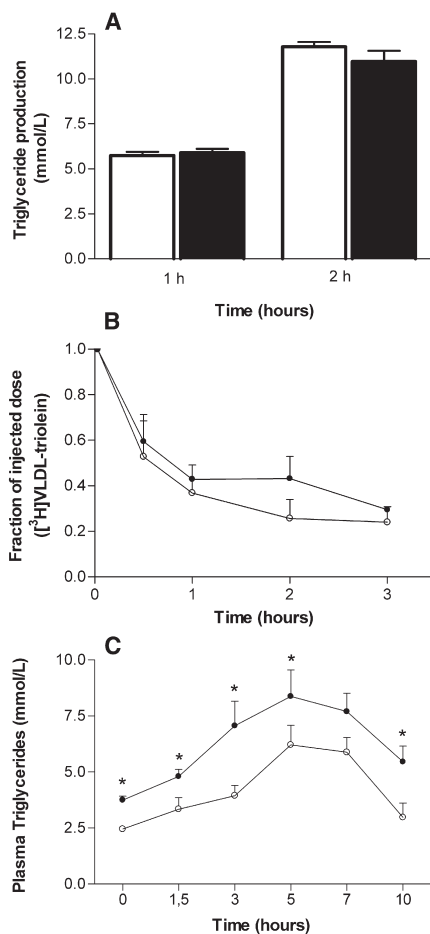


Fig. 2. *In vivo* triglycerides production (A), the decay of autologous [³H]VLDL-triglyceride injected intravenously (B) and the response to an oral fat tolerance test (C). In MCP-1^{-/-}LDLr^{-/-} mice (black bars and full circles) with respect to LDLr^{-/-} mice (white bars and circles). *p<0.05. There was no change in lipoprotein production but delayed clearance is likely.

fat is stored in adipose tissue and muscle are not clear, it is generally agreed that abnormalities of fatty acid delivery and storage underlie the metabolic derangement of insulin resistance. Further, epididymal fat pad mass was increased in MCP-1^{-/-}LDLr^{-/-} mice compared with LDLr^{-/-} mice (8.8±0.6 vs. 7.0±0.9 mg/g of mouse, *p*<0.05). The mechanism for this impaired metabolic regulation in our mice is unknown but differences in systemic inflammatory response is unlikely because plasma TNFα concentrations were similar in both models (2.8±0.5 vs. 3.1±0.6 pg/ml) but a differential response in the tissues involved cannot be discarded.

The addition of fat to the diet disclosed further differences between the two models. The relative hyperlipidemia observed in MCP-1^{-/-}LDLr^{-/-} mice at the 10-weeks time point was further confirmed (Fig. 3) but the differences rapidly disappear. The increase in plasma cholesterol concentration was faster in LDLr^{-/-} mice when fed a high-fat, high-cholesterol diet and at the 32-week time point, the absence of MCP-1 precipitated significantly lower plasma cholesterol levels. When fed regular chow, the course of plasma cholesterol concentration was similar. Despite initial differences in plasma triglycerides concentration, both strains showed the same course at the 24- and 32-week time points. These results are even more difficult to interpret because the LDLr^{-/-} mice developed obesity at the 32-weeks time, a condition that was prevented in MCP-1-deficient animals (Fig. 3C). There was, on average, a 9-fold increase in

plasma leptin concentration of LDLr^{-/-} mice (49.73±5.84 ng/ml) with respect to MCP-1^{-/-}LDLr^{-/-} mice (4.9±0.30 ng/ml) fed on a high-fat, high-cholesterol diet. At this 32-week time point, food intake was slightly smaller, but not significantly different, in LDLr^{-/-} (3.57±0.49 g/day) as compared with MCP-1^{-/-}LDLr^{-/-} mice (3.83±0.95 g/day). Although LDLr^{-/-} mice at this age showed higher adiposity, in the epididymal adipose tissue the adipocytes were significantly smaller (*p*<0.01) (1557±60 μm²) than in MCP-1^{-/-}LDLr^{-/-} mice (2107±76 μm²) suggesting that MCP-1 is clearly involved in the development and maintenance of diet-induced obesity when hyperlipemia is prominent. Also, the fraction of macrophages was significantly lower (*p*<0.01) in MCP-1^{-/-}LDLr^{-/-} mice (0.08±0.06) than in LDLr^{-/-} mice (0.19±0.05), a difference that deserves further research (Fig. 3D).

Because double KO mice also showed a significant increase in plasma FFA concentration, we predicted a link between these lipoprotein derangements and glucose metabolism. High plasma FFA concentration may cause peripheral insulin resistance but insulin resistance may also elicit a decreased uptake of fatty acids by the adipose tissue that promotes increased circulating plasma FFAs (Lewis et al., 2002; Baldeweg et al., 2000). Hyperlipemia may also be a confounding factor through an increase in the uptake of free fatty acids by the liver (Lewis, 1997). It is also well-known that LPL activity is stimulated by insulin and glucose; hence, an LPL activity disturbance in

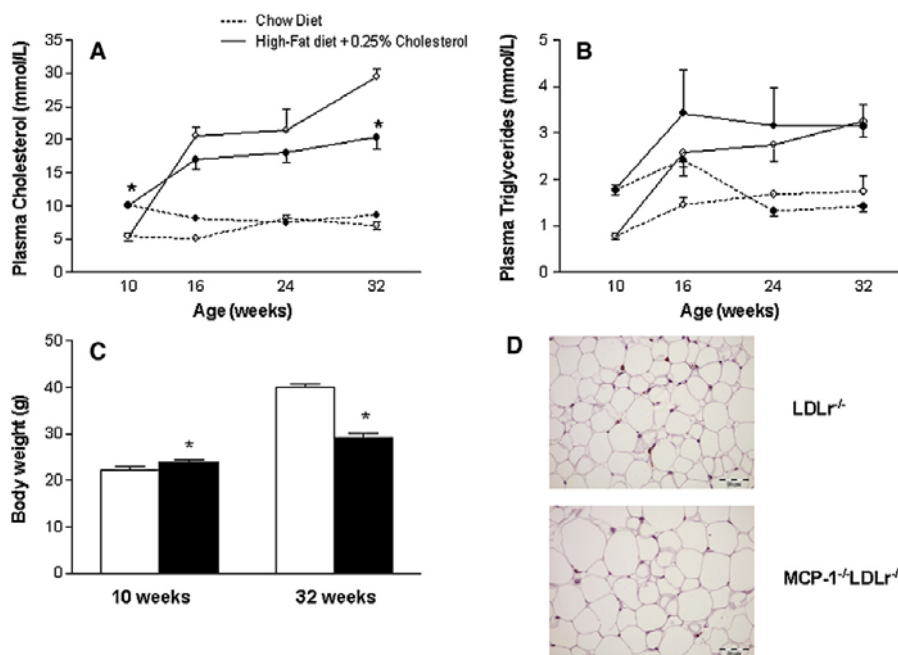


Fig. 3. Course of plasma cholesterol (A) and triglycerides concentrations (B) in LDLr^{-/-} mice (white circles and bars) and MCP-1^{-/-}LDLr^{-/-} mice (black circles and bars) fed either a chow diet or a high-fat diet supplemented with cholesterol (0.25% w/w) for 22 weeks of treatment. (C) Body weight before the dietary treatment and at the 32-week time point after a high-fat diet supplemented with cholesterol (0.25% w/w) indicating a resistance to diet-induced obesity in double KO mice, which is accompanied by an increase in the adipocyte size in the epididymal fat (D). **p*<0.05 vs. LDLr^{-/-} mice in the same dietary group.

adipose tissue may also be an indicator of alterations in glucose metabolism (Fielding and Frayn, 1998; Farese et al., 1991).

We found higher fasting plasma glucose concentration in MCP-1^{-/-}LDLr^{-/-} mice than in LDLr^{-/-} mice (Table 1). The response to the glucose overload was also less intense and slower (Fig. 4A) in the double knockout mice in which the area under the curve was 1.7-fold higher and the plasma insulin levels, although similar in both models, remained higher at the 60-min time point (Fig. 4C). It is noteworthy that normolipemic MCP-1^{-/-} mice showed also an abnormal tolerance to the injected glucose. We did not observe significant differences in the insulin tolerance tests but there was a trend towards impaired insulin sensitivity in the MCP-1^{-/-}LDLr^{-/-} mice (Fig. 4D). As expected (Paolisso et al., 1992), glucose tolerance was significantly worse in LDLr^{-/-} mice fed on a high-fat, high-cholesterol diet at the 32-week time point but we noted certain improvement in MCP-1^{-/-}LDLr^{-/-} mice (Fig. 4B). Taken together, these results indicate that MCP-1 is important in both lipid and glucose metabolism and its role may differ in response to both hyperlipidemia and the ingestion of dietary fat and cholesterol. These results may also suggest that circulating MCP-1 may have endocrine effects in different tissues.

Transgenic overexpression of MCP-1 in adipose tissue results in systemic insulin resistance in mice fed a high-fat diet (Kanda et al., 2006; Kamei et al., 2006). Mice lacking CCR2 show an improved systemic glucose homeostasis with reduced

macrophage content in adipose tissue while on a high-fat diet (Weisberg et al., 2006). This contrasts with the recent findings indicating that the absence of MCP-1 in mice is not critical for adipose tissue macrophage recruitment and impairs lipid and glucose metabolism (Inouye et al., 2007). We partially confirm these findings in mice rendered hyperlipemic by the ablation of the LDLr gene. However, we also describe contrary effects that may be influenced by the dietary fat, hyperlipidemia, age and possibly obesity. In lean and young mice, in which there is not macrophage infiltration, MCP-1 seems responsible for a decreased lipoprotein clearance as well as a clear impairment in glucose metabolism. Conversely, when mice are fed a high-fat diet and, consequently, macrophage infiltration is likely, the absence of MCP-1 seems to be a modulating factor of improvement in both glucose and lipid metabolism.

In conclusion, our data suggest an intense and relevant metabolic role of MCP-1 that is not clearly defined, indicating the presence of multiple layers of regulatory mechanisms that may be influenced by MCP-1. Our results should be considered in a framework including the relationships among the presence or absence of inflammation and/or hyperlipidemia, the action of proinflammatory cytokines and the metabolic consequences of dietary fat, physiological stress and insulin resistance (Hotamisligil et al., 1993). These influences should be fully ascertained before considering MCP-1 as a therapeutic target.

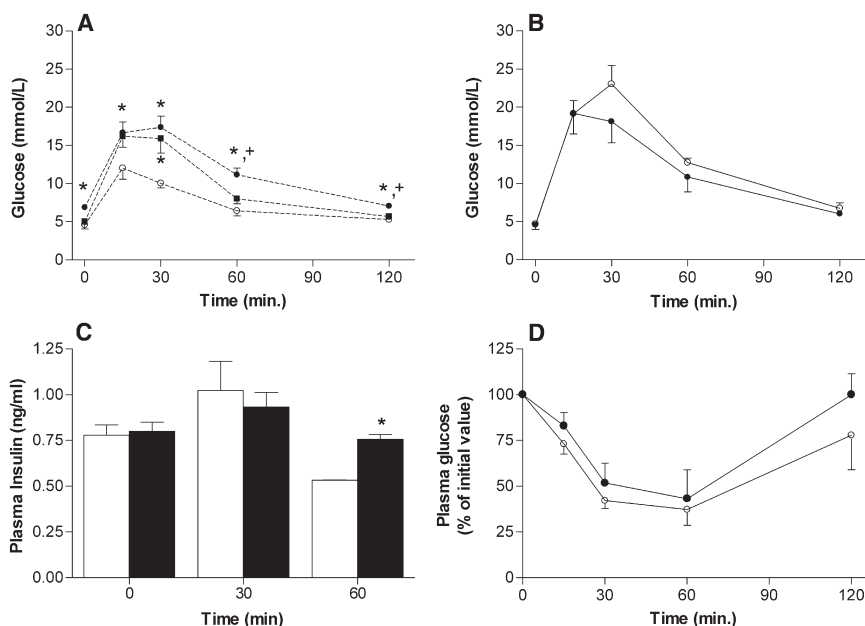


Fig. 4. Glucose tolerance tests in LDLr^{-/-} mice (white circles), MCP-1^{-/-}LDLr^{-/-} mice (black circles) and MCP-1^{-/-} mice (black squares). Mice were fed a chow diet (age 11–12 weeks) (A) or a high-fat diet supplemented with cholesterol (0.25% w/w) for 22 weeks (B). Plasma insulin concentrations determined by RIA in LDLr^{-/-} mice (white bars) and MCP-1^{-/-}LDLr^{-/-} mice (black bars) during the glucose tolerance tests are in panel C and the blood glucose concentration during the insulin tolerance test in panel D. **p*<0.05 vs. LDLr^{-/-} mice and +*p*<0.05 vs. MCP-1^{-/-} mice.

Acknowledgments

This study was supported by the grant 05/1606 from the Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) and the Instituto de Salud Carlos III (RETIC RD06). Anna Rull is a recipient of a fellowship from the Generalitat de Catalunya (FI-G 0503). Joan Carles Escolà is a Ramon y Cajal researcher, funded by the Ministerio de Educación y Ciencia.

References

- Baldeweg, S.E., Golay, A., Natali, A., Balkau, B., Del Prato, S., Coppack, S.W., 2000. Insulin resistance, lipid and fatty acid concentrations in 867 healthy Europeans. *Eur. J. Clin. Invest.* 30, 45–52.
- Boring, L., Gosling, J., Cleary, M., Charo, I.F., 1998. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 394, 894–897.
- Chen, A., Mumick, S., Zhang, C., Lamb, J., Dai, H., Weingarh, D., Mudgett, J., Chen, H., MacNeil, D.J., Reitman, M.L., Qian, S., 2005. Diet induction of monocyte chemoattractant protein-1 and its impact on obesity. *Obes. Res.* 13, 1311–1320.
- Cushing, S.D., Berliner, J.A., Valente, A.J., Territino, M.C., Navab, M., Parhami, F., Gerrety, R., Schwartz, C.J., Fogelman, A.M., 1990. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 5134–5138.
- Escola-Gil, J.C., Julve, J., Marzal-Casacuberta, A., Ordonez-Llanos, J., Gonzalez-Sastre, F., Blanco-Vaca, F., 2000. Expression of human apolipoprotein A-II in apolipoprotein E-deficient mice induces features of familial combined hyperlipidemia. *J. Lipid Res.* 41, 1328–1338.
- Farese Jr., R.V., Yost, T.J., Eckel, R.H., 1991. Tissue-specific regulation of lipoprotein lipase activity by insulin/glucose in normal-weight humans. *Metabolism* 40, 214–216.
- Fielding, B.A., Frayn, K.N., 1998. Lipoprotein lipase and the disposition of dietary fatty acids. *Br. J. Nutr.* 80, 495–502 (Review).
- Gu, L., Okada, Y., Clinton, S.K., Gerard, C., Sukhova, G.K., Libby, P., Rollins, B.J., 1998. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol. Cell* 2, 275–281.
- Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S., Spiegelman, B.M., 1993. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259, 87–91.
- Inouye, K.E., Shi, H., Howard, J.K., Daly, C.H., Lord, G.M., Rollins, B.J., Flier, J.S., 2007. Absence of CC chemokine ligand 2 does not limit obesity-associated infiltration of macrophages into adipose tissue. *Diabetes* 56, 2242–2250.
- Julve, J., Robert, M.Q., Llobera, M., Peinado-Onsurbe, J., 1996. Hormonal regulation of lipoprotein lipase activity from 5-day-old rat hepatocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 116, 97–104.
- Julve, J., Escola-Gil, J.C., Marzal-Casacuberta, A., Ordonez-Llanos, J., Gonzalez-Sastre, F., Blanco-Vaca, F., 2000. Increased production of very-low density lipoproteins in transgenic mice overexpressing human apolipoprotein A-II and fed with a high-fat diet. *Biochim. Biophys. Acta* 1488, 233–244.
- Kamei, N., Tobe, K., Suzuki, R., Ohsugi, M., Watanabe, T., Kubota, N., Ohtsuka-Kawatari, N., Kumagai, K., Sakamoto, K., Kobayashi, M., Yamauchi, T., Ueki, K., Oishi, Y., Nishimura, S., Manabe, I., Hashimoto, H., Ohnishi, Y., Ogata, H., Tokuyama, K., Tsunoda, M., Ide, T., Murakami, K., Nagai, R., Kadowaki, T., 2006. Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *J. Biol. Chem.* 281, 26602–26614.
- Kanda, H., Tateya, S., Tamori, Y., Kotani, K., Hiasa, K., Kitazawa, R., Kitazawa, S., Miyachi, H., Maeda, S., Egashira, K., Kasuga, M., 2006. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J. Clin. Invest.* 116, 1494–1505.
- Lewis, G.F., 1997. Fatty acid regulation of very low density lipoprotein production. *Curr. Opin. Lipidol.* 8, 146–153 (Review).
- Lewis, G.F., Carpentier, A., Adeli, K., Giacca, A., 2002. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr. Rev.* 23, 201–229.
- Luster, A.D., 1998. Chemokines—chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N. Engl. J. Med.* 338, 436–445.
- Nelken, N.A., Coughlin, S.R., Gordon, D., Wilcox, J.N., 1991. Monocyte chemoattractant protein-1 in human atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest.* 88, 1121–1127.
- Paolisso, G., Ferrannini, E., Sgambato, S., Varricchio, M., D'Onofrio, F., 1992. Hyperinsulinemia in patients with hypercholesterolemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 75, 1409–1412.
- Ribas, V., Palomer, X., Roglans, N., Rotllan, N., Fievet, C., Tailleux, A., Julve, J., Laguna, J.C., Blanco-Vaca, F., Escola-Gil, J.C., 2005. Paradoxical exacerbation of combined hyperlipidemia in human apolipoprotein A-II transgenic mice treated with fenofibrate. *Biochim. Biophys. Acta* 1737, 130–137.
- Steinberg, D., Lewis, A., 1997. Conner Memorial Lecture, oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation* 95, 1062–1071.
- Tous, M., Ferre, N., Rull, A., Marsillach, J., Coll, B., Alonso-Villaverde, C., Camps, J., Joven, J., 2006a. Dietary cholesterol and differential monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in aorta and liver of apo E deficient mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340, 1078–1084.
- Tous, M., Ribas, V., Escola-Gil, J.C., Blanco-Vaca, F., Calpe-Berdiel, L., Coll, B., Ferre, N., Alonso-Villaverde, C., Rull, A., Camps, J., Joven, J., 2006b. Manipulation of inflammation modulates hyperlipidemia in apolipoprotein E-deficient mice: a possible role for interleukin-6. *Cytokine* 34, 224–232.
- Vilella, E., Joven, J., Fernandez, M., Vilaro, S., Brunzell, J.D., Olivecrona, T., Bengtsson-Olivecrona, G., 1993. Lipoprotein lipase in human plasma is mainly inactive and associated with cholesterol-rich lipoproteins. *J. Lipid Res.* 34, 1555–1564.
- Weisberg, S.P., Hunter, D., Huber, R., Lemieux, J., Slaymaker, S., Vaddi, K., Charo, I., Leibel, R.L., Ferrante Jr., A.W., 2006. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J. Clin. Invest.* 116, 115–124.

ESTUDI 2

Hepatic monocyte chemoattractant protein-1 is upregulated by dietary cholesterol and contributes to liver steatosis

Cytokine 48 (2009) 273-279

BREU RESUM

Inflamació i metabolisme es troben estretament lligats, i com a conseqüència la regulació i el manteniment de l'homeòstasi metabòlica requeriran la coordinació múltiple entre diferents òrgans. Un dels òrgans clau és el fetge, pel seu paper en el control de la homeòstasi energètica de tot l'organisme. L'objectiu d'aquest segon treball era explorar el paper de MCP-1 en la iniciació i la progressió de l'esteatosi hepàtica en un model susceptible a aquesta complicació metabòlica, el model LDLr^{-/-}, i del qual havíem comprovat en el treball anterior (Estudi 1) que la deficiència en MCP-1 alterava el metabolisme dels lípids i la glucosa. Es van utilitzar ratolins LDLr^{-/-} (Jackson Laboratory) de 10 setmanes d'edat per obtenir els valors basals (n= 8) i es van fer 2 grups d'estudi diferents per veure l'efecte de la dieta rica en greix i colesterol: dieta 1, dieta estàndard de manteniment (n= 24) i dieta 2, dieta estàndard de manteniment amb un suplement de 0.20% d'oli de palma i 0.25% (w/w) de colesterol (n= 24). En cada grup d'estudi es van fer tres subgrups (n= 8 per grup d'estudi), depenen de les setmanes de tractament dels animals: 1) 16 setmanes d'edat (6 setmanes de tractament); 2) 24 setmanes d'edat (14 setmanes de tractament) i 3) 32 setmanes d'edat (22 setmanes de tractament). Els estudis bioquímics i histològics van ser complementats amb l'anàlisi d'expressió de gens en el fetge. Finalment, per corroborar l'efecte de MCP-1 en l'esteatosi hepàtica vam crear un projecte preliminar amb ratolins MCP-1^{-/-}LDLr^{-/-} (Dana-Farber Cancer Institute) i MCP-1^{+/-}LDLr^{-/-} (heterozigots).

Els resultats van mostra com l'expressió gènica de MCP-1 en el teixit hepàtic és ràpidament induïda per la dieta i que a la vegada aquest increment és paral·lel a un increment de les concentracions de MCP-1 circulants i associat al nivell d'esteatosi hepàtica. Les tècniques immunohistoquímiques van corroborar l'expressió proteica de MCP-1 en el teixit hepàtic, els hepatòcits presentaven una intensa immunoreactivitat per MCP-1 que curiosament es trobava predominantment localitzada al voltant de les gotes de lípids. Tanmateix, la ingesta de colesterol també incrementava la concentració proteica de MCP-1 en el teixit hepàtic. Aquest fenomen es trobava acompanyat de diferències en

l'expressió dels gens membres de la família dels *Peroxisome proliferator-activated receptors* (PPARs).

Els resultats addicionals i completament preliminars amb els models totalment (homozigots) i parcialment (heterozigots) deficients en MCP-1 completaven els resultats d'aquest segon treball. La deficiència parcial o total de MCP-1 (MCP-1^{+/-}LDLr^{-/-}, MCP-1^{-/-}LDLr^{-/-}) protegeix del desenvolupament d'esteatosi hepàtica en el aquest model d'estudi, el ratolí LDLr^{-/-}. Aquestes dades demostraven que MCP-1 és important en la regulació de la resistència a la insulina hepàtica i pot representar una molècula clau no només en la inflamació sinó també en el metabolisme, i per tant es confirmava la hipòtesi presentada en aquesta Tesi doctoral.

En resum, la sobre-regulació de MCP-1 en el fetge com a conseqüència de les dietes riques en greix i colesterol contribueix al desenvolupament de l'esteatosi hepàtica. I per tant, la inducció de l'expressió de MCP-1 mitjançant la dieta ens podria ajudar a entendre el paper de MCP-1 circulant en condicions on els problemes hepàtics són clínicament importants, així com estudiar l'associació de l'esteatosi hepàtica amb la síndrome metabòlica.

Per poder definir les vies d'actuació de MCP-1 en el fetge d'aquest model, primer era necessari establir les vies metabòliques que estaven afectades en la iniciació i progressió de l'esteatosi hepàtica. D'aquí el tercer estudi presentat en aquesta Tesi, on es va plantejar que la identificació i la quantificació de metabòlits associats a diferents vies metabòliques podia facilitar el descobriment de nous biomarcadors i dianes terapèutiques, com podia ser MCP-1.



Contents lists available at ScienceDirect

Cytokine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/issn/10434666



Hepatic monocyte chemoattractant protein-1 is upregulated by dietary cholesterol and contributes to liver steatosis

Anna Rull, Fernando Rodríguez, Gerard Aragonès, Judit Marsillach, Raúl Beltrán, Carlos Alonso-Villaverde, Jordi Camps, Jorge Joven*

Centre de Recerca Biomèdica, Hospital Universitari Sant Joan de Reus, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, c/Sant Joan s/n, 43201 Reus, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 May 2009

Received in revised form 24 July 2009

Accepted 20 August 2009

Keywords:

Dietary cholesterol

LDLr-deficient mice

Liver steatosis

MCP-1

Obesity

ABSTRACT

To assess the role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) in the development of fatty liver, we have used LDLr^{-/-} mice as an animal model of high-fat, high-cholesterol diet-induced liver steatosis. The rapid dietary induction of hepatic mRNA MCP-1 expression was paralleled by a concomitant increase in plasma MCP-1 that was strongly associated with the degree of liver steatosis. Hepatocytes showed an intense immunoreactivity for MCP-1 that was mainly located surrounding the hepatic lipid droplets. The intake of cholesterol also increased the concentration of MCP-1 in liver homogenates. This was accompanied by a differential expression of members of the PPAR family. Additionally, complete MCP-1 deficiency prevents the development of liver steatosis in LDLr^{-/-} mice and partial deficiency is accompanied by a certain protective effect. Our data also suggest that MCP-1 may be important in the regulation of hepatic insulin resistance and may represent a link between inflammation and metabolic diseases. We conclude that dietary cholesterol upregulation of hepatic MCP-1 may help to understand the role of circulating MCP-1 in conditions where liver derangements are clinically important and in the association of liver steatosis with the metabolic syndrome.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The clinical association of liver steatosis, obesity, hyperlipidemia, insulin resistance and atherosclerosis is usually related to inappropriately high-fat, high-cholesterol diets [1]. Therefore, the excess of some nutrients, through their role as important signaling molecules in transductional pathways [2], may be a major participant in the pathogenesis of the metabolic syndrome.

The dietary cholesterol-induced hepatic inflammation is a complex and poorly understood process in which chemokines are critically involved [3]. The hepatic monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) production in response to the fat and cholesterol intake and its contribution to the plasmatic pool has not been previously determined but it is likely that the leukocyte recruitment from the circulation during liver inflammation is a consequence of hepatic synthesis and release of MCP-1. It has been already documented that MCP-1 is upregulated in the adipose tissue during high-fat feeding, but it is plausible that MCP-1 may be expressed and secreted by virtually all somatic cells [4–10]. Notably, the soluble forms of MCP-1/CCL2 are readily detected in plasma where they may contribute to systemic effects and metabolic regulation [11]. We, and others [12–18], have studied plasma MCP-1/CCL2 in a

number of pathological conditions characterized by liver monocyte infiltration and have found that plasma MCP-1 concentration is consistently increased and represents a significant predictor of liver disease, hepatic inflammation and also of low-grade systemic inflammation.

Inflammation and metabolism are closely interconnected and the regulation of both processes requires communication between multiple tissues. Recent findings reinforce the concept that the liver may play a pivotal role documenting that the adipose tissue regulates hepatic insulin resistance [19] and that the liver may regulate pancreatic β cell mass [20]. Taken together, our data suggest that the hepatic over-expression of MCP-1 in response to a high-fat, high-cholesterol diet in hyperlipemic mice may represent a contributing factor for the development of liver steatosis and other metabolic derangements.

2. Material and methods

2.1. Experimental animals and diets

All procedures were performed in accordance with our Institutional guidelines. All mice used in this study were in C57BL/6J background and were housed under standard conditions and given a commercial mouse diet (14% Protein Rodent Maintenance diet, Harlan, Barcelona, Spain) until the experiment begins. Male

* Corresponding author. Tel.: +34 977 310300; fax: +34 977 312569.
E-mail address: jjoven@grupsagessa.com (J. Joven).

LDLr^{-/-} mice were the progeny of mice purchased to the Jackson Laboratory. The size of the experiment was planned according to previous data [6]. The animals were allocated to experimental groups by computer-generated randomization schedules. At 10-weeks of age, 8 animals of LDLr^{-/-} strain were sacrificed and variables analyzed (baseline values). The remaining littermates were assigned to 2 dietary groups ($n = 24$ each). Diet 1 is the same maintenance diet (3% weight fat, 0.03% cholesterol) and mice were considered as controls; diet 2 was prepared with the addition to diet 1 of cholesterol (0.25% w/w) and palm oil as the source of fat (20% w/w). Diets were prepared and labeled by an independent investigator according to the randomization schedule to assure allocation concealment. At 16, 24 and 32 weeks of age, variables were analyzed in 8 animals of each group.

The male double knockout mice, LDLr^{-/-}MCP-1^{-/-} were kindly provided by the Dana Farber Cancer Institute and the heterozygotes LDLr^{-/-}MCP-1^{+/-} derived by breeding. We studied the development of liver steatosis in these mice that were equally handled. There were no animals excluded from analysis. Investigators responsible for the different assessment of outcomes had no knowledge of the experimental group to which the animals belong.

2.2. Laboratory measurement

Blood samples were collected from anesthetized animals into EDTA-treated blood collection tubes after 12 h of food deprivation. When applicable, MCP-1 concentration in plasma and liver homogenates was measured using an ELISA kit (Mouse MCP-1 ELISA kit, Pierce, Rockford, USA). Plasma glucose, AST, ALT and cholesterol concentration were determined by standard laboratory procedures. Plasma insulin concentrations were measured using a radioimmunoassay (Linco, St. Charles, MO). The livers were perfused, removed, prepared in portions and either flash-frozen and stored at -80°C until used or fixed for 24 h in 10% neutral-buffered formalin for histology. A portion of the liver was weighed, frozen in liquid nitrogen, homogenized in ice-cold PBS (5 mL PBS per 1 g of tissue) and centrifuged at 13,000g for 10 min at 4°C for measurement of MCP-1 and protein concentration. The liver-tissue content of cholesterol and triglycerides was determined after lipid extraction with isopropyl alcohol-hexane.

2.3. Assessment of liver morphology

The amount of MCP-1-stained cells was revealed using specific antibodies from Santa Cruz Biotechnology, CA, USA. For each individual mouse, 30 fields from each of 3 different sections were analyzed. The amount of inflammation and the degree of steatosis were estimated as previously described [6]. Oil Red O stains was prepared using reagents from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA. Other immunoreactivity studies were performed using specific antibodies from Santa Cruz Biotechnology. Quantitative measurements were performed by using the image analysis software, AnaliSYS™ (Soft Imaging System, Münster, Germany).

2.4. Analysis of mRNA expression

Total RNA was isolated from liver tissue using the ABI PRISM 6100 (Applied Biosystems, Foster City, USA). TaqMan primers and probes were obtained from validated Assays-on-Demand products (Applied Biosystems) (Assays ID, Mm00441242-m1, *ccl2*; Mm00440939-m1, *ppar α* ; Mm00803186-g1, *ppar δ* ; Mm00440945-m1, *ppar γ*) to be used in real time PCR amplifications on the 7900HT Real Time PCR system. Relative transcript levels were quantified as a comparison of measured threshold cycle numbers (Ct) for each reaction to a designated endogenous control via the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method.

2.5. Statistical analyses

Data were initially analyzed using ANOVA (single-factor or two-factor) and when necessary U Mann–Whitney or Student's unpaired *t*-test, with the level of significance set at $p < 0.05$. The SPSS/PC + 12.0 (SPSS, Chicago, IL) software was used throughout.

3. Results

3.1. The metabolic response to high-fat, high-cholesterol diet in LDLr^{-/-} mice

We first assessed the metabolic response of LDLr^{-/-} mice to high-fat diet using diet 2 as a source of cholesterol that resembles the total amount ingested in Western-type diet. Mice were assessed with respect to the development of liver steatosis and expected MCP-1 overstimulation. The food intake was similar in all the experimental groups (data not shown). However, mice on diet 2 increased their body weight as an age-dependent effect, doubled that observed in mice on normal chow and the maximal difference reached after 22 weeks of dietary treatment (Fig. 1A). These changes were paralleled by significant increases in plasma glucose and insulin concentrations (Fig. 1B) at the end of dietary treatment that correlated with the increased body weight, indicating the presence of different degrees of adiposity-induced insulin resistance. Similarly, plasma cholesterol and triglyceride concentrations increased significantly in mice on high-fat diet respect to the control group (Fig. 1C). The relative liver weight respect to body weight increased constantly in mice fed high-fat, high-cholesterol diet and decreased in mice fed the chow diet (Fig. 1D). Cellular necrosis is unlikely as a response to high-fat diets because we did not observe changes in plasma transaminases in any of the experimental groups (data not shown). This trend was also accompanied by a significant increase in the content of liver cholesterol and triglyceride (Fig. 1E, F). This higher hepatic lipid storage was further confirmed examining the amount of Oil red O stained cells (Fig. 1G, H).

3.2. Hepatic MCP-1 is upregulated by the abundance of fat and cholesterol in the diet

We then examined the relative MCP-1 transcript abundance in the livers and we found a consistently higher rate of transcription in mice on high-fat diet respect to controls (Fig. 2A). This diet-induced hepatic MCP-1 mRNA expression was rapid and maximal after 6 weeks of treatment although it remained significantly high in all the time-points. These results were similar to those obtained assessing the MCP-1 immunoreactivity. The immunoreactivity for MCP-1 in macrophages/Kupffer cells, in vascular and bile duct endothelial cells, and in some leukocytes were higher ($p < 0.01$) in mice fed high-fat diet than in those on regular chow. Hepatocytes, when placed in close vicinity to inflammatory infiltrates, were also strongly stained (Fig. 2E). Interestingly, MCP-1 was detected in every cell with a significant degree of steatosis and predominantly located in the periphery of hepatic lipid droplets (Fig. 2F). In liver homogenates (Fig. 2B), we found that hepatic MCP-1 concentration was similar in mice on diets 1 and 2. The measured MCP-1 concentration in plasma paralleled the response obtained with mRNA transcription analysis. This relationship is not appreciated with the expression of the protein in the liver (Fig. 2B, C). Such apparent discrepancy may indicate a continuous exit from the cell and consequently that hepatocytes may be the source of increased plasma MCP-1 levels. However this cannot be inferred from our model in which other organs may contribute. Particularly the adipose tissue, because plasma MCP-1 correlated

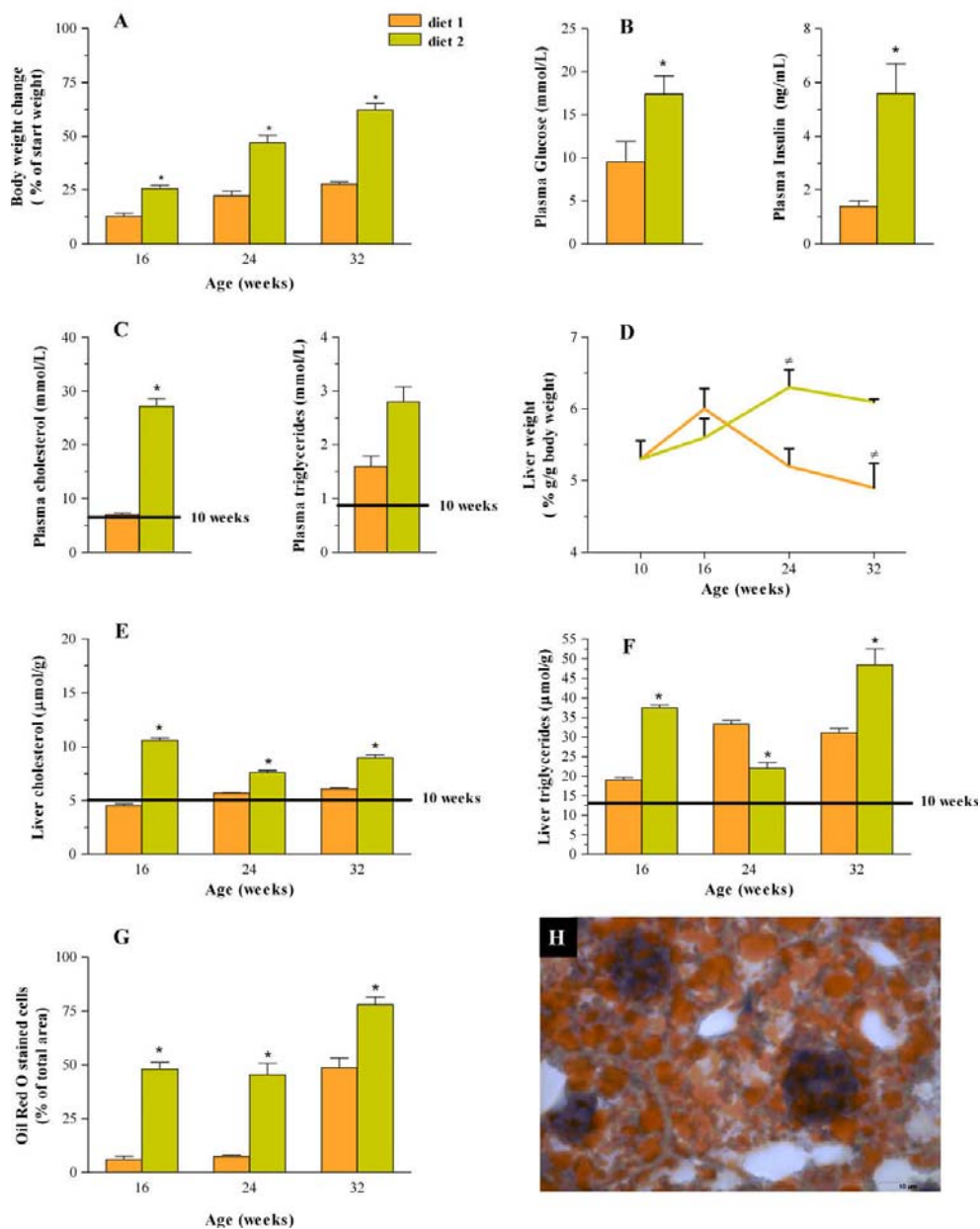


Fig. 1. The excess of nutrients elicited a metabolic stress in LDLr^{-/-} mice. There was a high propensity to gain weight (A), insulin resistance (B) and hyperlipidemia (C). These effects were accompanied by a higher relative liver weight respect to body weight (D) as a response to higher accumulation of cholesterol and triglyceride in the liver (E and F), confirmed histologically by the staining of neutral lipids (G) from which a representative microphotograph is shown of liver in LDLR-deficient mice fed diet 2 at the 32-weeks time-point. Values are mean ± SD. *p* < 0.001 and **p* < 0.01 respect to diet 1.

(*r* = 0.635) with the increase in body weight and the increased adiposity observed. In addition, the course in plasma MCP-1 concentration also correlated (*r* = 0.721) with the degree of steatosis, which was consistently higher in mice on high-fat, high-cholesterol diet as assessed by histological analysis (Fig. 2G). All these

data suggest that the expression of MCP-1 is determined by the dietary manipulations. To further assess the role of inflammatory stimuli, we evaluated the proportion of hepatic F4/80 stained cells, a specific marker of mature macrophages. We found no significant changes in the degree of macrophage infiltration in mice with re-

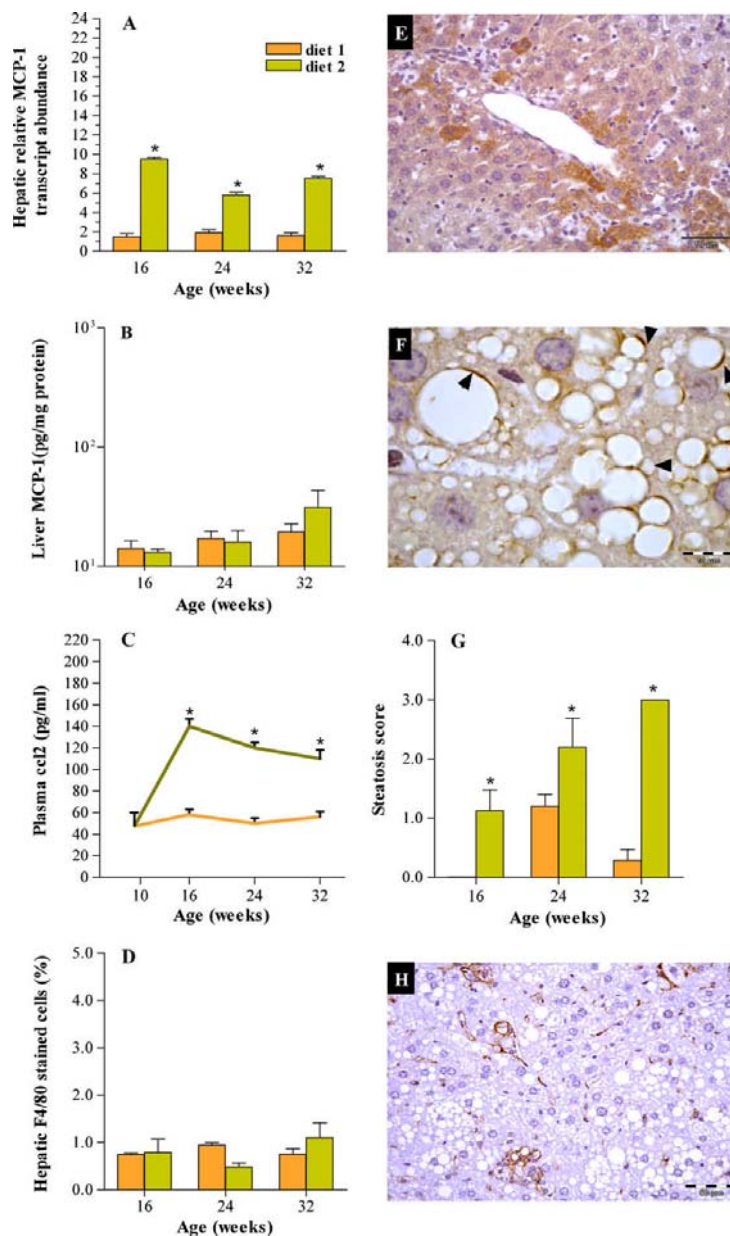


Fig. 2. Hepatic MCP-1 is upregulated by dietary cholesterol and is associated with the degree of steatosis. The relative MCP-1 transcript abundance (A), and MCP-1 concentration in liver homogenates (B) and plasma (C) showed a strong association with the experimental diet. Most hepatic cells showed MCP-1 immunoreactivity especially when located in close vicinity to inflammatory infiltrates (E) and in every cell with a significant degree of steatosis where it was mainly located in the periphery of lipid droplets (F). MCP-1 over-expression correlated with liver steatosis as measured with the steatosis score (G). This relationship was not observed with the degree of macrophage infiltration measured by the proportion of hepatic F4/80 stained cells (D and H). Values are mean \pm SD. $p < 0.001$ with respect to diet 1.

spect to the composition of the diet (Fig. 2D, H) and this was not correlated with the increase in either plasma or liver MCP-1. It is therefore unlikely that the mechanism of action of MCP-1 could be related to increased monocyte recruitment. We then investigated the gene expression of liver peroxisome proliferator-

activated receptors (PPARs α , γ and β/δ) which are related to the MCP-1 expression in experimental liver disease and play important documented roles in lipogenesis and inflammation. This was performed measuring the relative transcript abundance and using immunohistochemistry to assess the correspondence with the pro-

tein expression. The dietary response in PPAR α expression was similar in diets 1 and 2 (Fig. 3A). Conversely, the PPAR γ expression was moderately increased in diet 2 respect to chow diet (Fig. 3B). We also found a negative PPAR β/δ expression response to the dietary treatment. Whereas diet 1 did not elicit a significant response, a significant decrease in the expression throughout the study was observed with high-fat, high-cholesterol diet (Fig. 3C).

3.3. MCP-1 is a necessary factor to develop diet-induced liver steatosis

To ascertain if MCP-1 may play a prominent role in the mechanisms of hepatic lipid accumulation, we then included in the experiment a group of male double KO mice (LDLr^{-/-}MCP-1^{-/-}; n=8) fed the diet 2 and liver steatosis was examined after 22 weeks of treatment. Results were compared with those obtained in controls (LDLr^{-/-}MCP-1^{+/+}) and heterozygotes (LDLr^{-/-}MCP-1^{+/-})

(n = 8 for each group). We found that the deficiency in MCP-1 does not completely prevent the development of liver steatosis as assessed at the 32-week time-point but the degree of steatosis decreased considerably. Also, morphology was substantially changed and, when present, it was mainly microvesicular. Moreover, the double KO mice heterozygote for MCP-1 (LDLr^{-/-}MCP-1^{+/-}) showed an intermediate degree of hepatic lipid accumulation indicating that the hepatic MCP-1 expression could be a quantitative requirement for hepatic steatosis (Fig. 4).

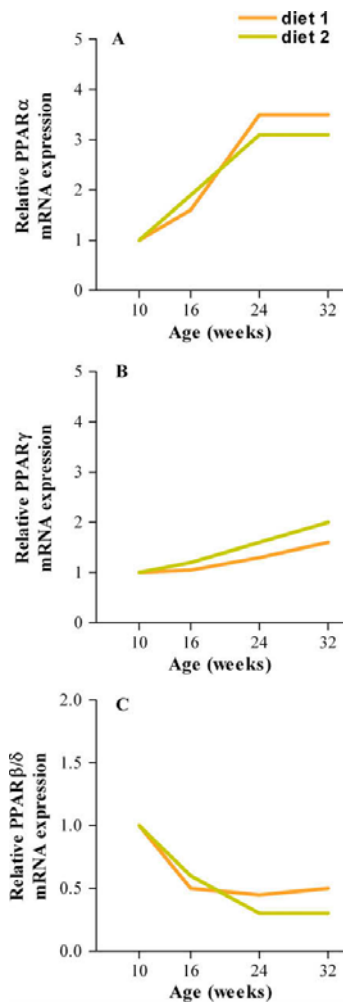


Fig. 3. PPAR α , γ and β/δ expression in liver tissue. The dietary response in PPAR α expression (A) was similar in diets 1 and 2. The PPAR γ expression was moderately increased in diet 2 respect to chow diet (B). Conversely, there was a significant decrease in the expression of PPAR β/δ (C) in mice on high-fat, high-cholesterol diet.

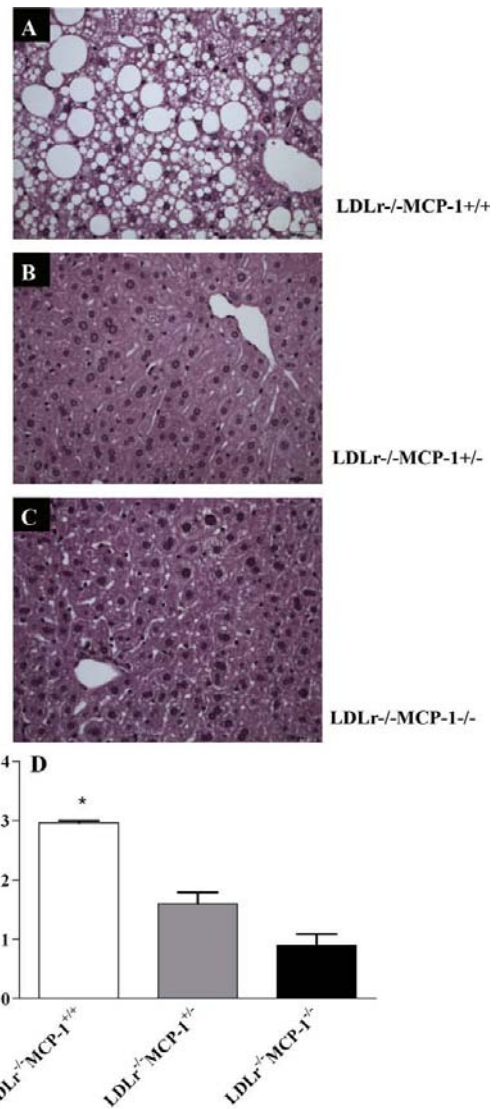


Fig. 4. The influence of MCP-1 in the development of diet-induced liver steatosis. Representative microphotographs of liver tissue of the indicated strains (A-C) after feeding mice (n = 8 for each group) with high-fat, high-cholesterol diet (diet 2) during 22 weeks. (D) Quantitative measurement of the degree of steatosis in the groups studied. In LDLr^{-/-}MCP-1^{-/-} mice, steatosis was microscopically undetectable in most samples although a limited extent of microvesicular steatosis was detected in others. p < 0.001 respect to MCP-1 deficient animals.

4. Discussion

We have shown that dietary fat and cholesterol, inappropriately high in the Western-type diet, are potent inducers of the hepatic expression of the MCP-1 gene in this animal model which is accompanied by intense MCP-1 immunoreactivity in hepatocytes and a related and significant increase of MCP-1 concentration in plasma and liver homogenates. None of these effects were present in hyperlipemic mice on normal, low-fat chow. Therefore, MCP-1 upregulation is not associated with hyperlipidemia but to the diet-induced metabolic stress responsible of concomitant glucose and lipoprotein derangements. Particularly, the excess of nutrients increased the propensity to gain weight, to present insulin resistance and we found a strong dose-dependent relationship between the hepatic MCP-1 upregulation and the extent and severity of liver steatosis. Upon lipid loading of hepatocytes, MCP-1 was detected at or near the protein envelope of the lipid droplets, a suggesting finding that argues in favor of a determinant role of hepatic MCP-1 in the frequent association between the cytoplasmic accumulation of lipid in hepatocytes and the metabolic syndrome [18]. Such relationship may be quantitative. In the complete absence of MCP-1 the development of fatty liver is nearly prevented and in heterozygotes, which presumably have a limited potential for MCP-1 over-expression, the degree of liver steatosis is also considerably limited.

Our data also suggest that the liver is a major contributing organ to the plasma MCP-1 pool. There is not an available method to specifically address the question of which are the cellular sources of circulating plasma MCP-1 but it is plausible that some other tissues may contribute. Particularly, the role of the adipose tissue has been previously documented [21–23]. We also suggest that, in the liver, MCP-1 expression could be involved in a complex metabolic network. Our observations seem to confirm previous results obtained *in vitro* indicating that MCP-1 may induce lipid accumulation in hepatocytes via activation of PPAR α gene expression [24]. Also, the differential PPAR α and γ gene expression may support previous data indicating their role in the regulation of multiple lipogenic genes [25] in which MCP-1 may play a significant role [26]. The differential response on PPAR β/δ expression is intriguing. A recent study has revealed potential implications of PPAR β/δ in lipid homeostasis and insulin resistance [27]. Moreover, the PPAR β/δ over-expression in hepatocytes and treatment with PPAR β/δ agonists markedly reduce the intracellular lipid accumulation. According to this concept, the reduced PPAR β/δ expression in LDLr^{-/-} mice may contribute to the development of liver steatosis. Further studies are necessary to explore the relationship between MCP-1 and PPAR β/δ that our data suggest.

Another important question to be addressed is whether plasma circulating MCP-1 may play a role in distant tissues and consequently may influence the relative contribution of the different pathologies associated with the metabolic syndrome. The metabolic dysfunction observed in our mice clearly arises from exposure to an excess of nutrients which develops inflammation and probably secretion of multiple cytokines. These molecules may have the ability to influence the whole body energy balance and inflammatory mediators, such as MCP-1, circulating in plasma, may reach every cell and may play an important role in spreading cell signaling and activation. Plasma MCP-1, then, could be a good candidate to be such a common metabolic link as supported by data indicating that MCP-1 possesses physiological activities going far beyond the recruitment of immune cells [22,28–32].

In conclusion, the hepatic MCP-1 upregulation induced by dietary fat and cholesterol contributes to the development of liver steatosis. This may be important in the understanding of metabolic syndrome because the liver is the main organ in regulating the

metabolic homeostasis and it is continually exposed to the threat of inappropriate diets. Dietary intervention is pivotally positioned in the management of metabolic disturbances but our data suggest potential therapeutic applications for MCP-1 and/or PPAR β/δ modulators.

Acknowledgments

Supported by the Grant PI 051606 from the Fondo de Investigación Sanitaria (FIS). Anna Rull is a recipient of a fellowship from the Generalitat de Catalunya (FI-G 0503).

References

- [1] Targher G, Bertolini L, Padovani R, Poli F, Scala L, Zenari L, et al. Non-alcoholic fatty liver disease is associated with carotid artery wall thickness in diet-controlled type 2 diabetic patients. *J Endocrinol Invest* 2006;29:55–60.
- [2] Marshall S. The hexosamine signaling pathway: a new road to drug discovery. *Curr Opin Endocrinol Diab* 2002;9:160–7.
- [3] Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 1998;392:565–8.
- [4] Gerard C, Rollins BJ. Chemokines and disease. *Nat Immunol* 2001;2:108–15.
- [5] Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante Jr AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003;112:1796–808.
- [6] Tous M, Ferre N, Rull A, Marsillach J, Coll B, Alonso-Villaverde C, et al. Dietary cholesterol and differential monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in aorta and liver of apo E-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;340:1078–84.
- [7] Castro C, Campistol JM, Sancho D, Sanchez F, Casals E, Andrés V. Rapamycin attenuates atherosclerosis induced by dietary cholesterol in apolipoprotein-deficient mice through a p27^{Kip1}-independent pathway. *Atherosclerosis* 2004;172:31–8.
- [8] Chen YL, Chang YJ, Jiang MJ. Monocyte chemoattractant protein-1 gene and protein expression in atherosclerosis of hypercholesterolemic rabbits. *Atherosclerosis* 1999;143:115–23.
- [9] Vergnes L, Phan J, Strauss M, Tafuri S, Reue K. Cholesterol and cholate components of an atherogenic diet induce distinct stages of hepatic inflammatory gene expression. *J Biol Chem* 2003;278:42774–84.
- [10] Tous M, Ferre N, Camps J, Riu F, Joven J. Feeding apolipoprotein E-knockout mice with cholesterol and fat enriched diets may be a model of non-alcoholic steatohepatitis. *Mol Cell Biochem* 2005;268:53–8.
- [11] Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, et al. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* 2000;52:145–76.
- [12] Marsillach J, Bertran N, Camps J, Ferre N, Riu F, Tous M, et al. The role of circulating monocyte chemoattractant protein-1 as a marker of hepatic inflammation in patients with chronic liver disease. *Clin Biochem* 2005;38:1138–40.
- [13] Leifeld L, Dumoulin FL, Purr I, Janberg K, Trautwein C, Wolff M, et al. Early up-regulation of chemokine expression in fulminant hepatic failure. *J Pathol* 2003;199:335–44.
- [14] Haukeland JW, Damas JK, Jonkowski Z, Loberg EM, Haaland T, Goverud I, et al. Systemic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease is characterized by elevated levels of CCL2. *J Hepatol* 2006;44:1167–74.
- [15] Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, et al. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell* 1998;2:275–81.
- [16] Gosling J, Slaymaker S, Gu L, Tseng S, Zlot CH, Young SG, et al. MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. *J Clin Invest* 1999;103:773–8.
- [17] Yu X, Druz S, Graves DT, Zhang L, Antoniadis HN, Hollander W, et al. Elevated expression of monocyte chemoattractant protein 1 by vascular smooth muscle cells in hypercholesterolemic primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:6953–7.
- [18] Coll B, Alonso-Villaverde C, Joven J. Monocyte chemoattractant protein-1 and atherosclerosis: is there room for an additional biomarker? *Clin Chim Acta* 2007;383:21–9.
- [19] Sabio G, Das M, Mora A, Zhang Z, Jun J, Ko H, et al. A stress signaling pathway in adipose tissue regulates hepatic insulin resistance. *Science* 2008;322:1539–43.
- [20] Imai J, Katagiri H, Yamada T, Ishigaki Y, Suzuki T, Kudo H, et al. Regulation of pancreatic beta cell mass by neuronal signals from the liver. *Science* 2008;322:1250–4.
- [21] Chen A, Mumick S, Zhang C, Lamb J, Dai H, Weingarth D, et al. Diet induction of monocyte chemoattractant protein-1 and its impact on obesity. *Obes Res* 2005;13:1311–20.
- [22] Sartipy P, Loskutov DJ. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:7265–70.
- [23] Takahashi K, Mizurairi S, Araki H, Mashiko S, Ishihara A, Kanatani A, et al. Adiposity elevates plasma MCP-1 levels leading to the increased CD11b-positive monocytes in mice. *J Biol Chem* 2003;278:46654–60.

- [24] Gao B. Cytokines, STATs and liver disease. *Cell Mol Immunol* 2005;2:92–100.
- [25] Stienstra R, Duval C, Müller M, Kersten S. PPARs, obesity, and inflammation. *PPAR Res* 2007;2007:95974.
- [26] Marsillach J, Camps J, Ferré N, Beltran R, Rull A, Mackness B, et al. Paraoxonase-1 is related to inflammation, fibrosis, PPAR delta in experimental liver disease. *BMC Gastroenterol* 2009;9:3.
- [27] Qin X, Xie X, Fan Y, Tian J, Guan Y, Wang X, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-delta induces insulin-induced gene-1 and suppresses hepatic lipogenesis in obese diabetic mice. *Hepatology* 2008;48:432–41.
- [28] Clément S, Juge-Aubry C, Sgroi A, Conzelmann S, Paziienza V, Pittet-Cuenod B, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 secreted by adipose tissue induces direct lipid accumulation in hepatocytes. *Hepatology* 2008;48:799–807.
- [29] Gavrilova O, Haluzik M, Matsusue K, Cutson JJ, Johnson L, Dietz KR, et al. Liver peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass. *J Biol Chem* 2003;278:34268–76.
- [30] Sedlmeier EM, Grallert H, Huth C, Lowel H, Herder C, Strassburger K, et al. Gene variants of monocyte chemoattractant protein 1 and components of metabolic syndrome in KORA S4, Augsburg. *Eur J Endocrinol* 2007;156:377–85.
- [31] Coll B, van Wijk JP, Parra S, Castro Cabezas M, Hoepelman IM, Alonso-Villaverde C, et al. Effects of rosiglitazone and metformin on postprandial paraoxonase-1 and monocyte chemoattractant protein-1 in human immunodeficiency virus-infected patients with lipodystrophy. *Eur J Pharmacol* 2006;544:104–10.
- [32] Rull A, Escolà-Gil JC, Julve J, Rotllan N, Calpe-Berdiel L, Coll B, et al. Deficiency in monocyte chemoattractant protein-1 modifies lipid and glucose metabolism. *Exp Mol Pathol* 2007;83:361–6.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLAMACIÓ COM A NEXE D'UNIÓ ENTRE OBESITAT I COMPLICACIONS METABÒLIQUES: ESTEATOSI
HEPÀTICA.

Anna Rull Aixa
DL: T-1516-2011

ESTUDI 3

Metabolomic assessment of the Effect of Dietary cholesterol in the Progressive Development of Fatty Liver Disease

Journal of Proteome Research 9 (2010) 2527-2538

BREU RESUM

L'esteatosi hepàtica es considera com la manifestació hepàtica de la síndrome metabòlica i correntment està relacionada amb les dietes riques en greix i colesterol. En el present estudi vam realitzar un estudi metabolòmic del teixit hepàtic del model deficient en el receptor de les LDL, per investigar els efectes del greix i el colesterol de la dieta en la etiologia de la progressió de l'esteatosi hepàtica a esteatohepatitis. L'objectiu era la identificació i la quantificació dels metabòlits dels diferents processos metabòlics implicats, i que puguin facilitar el descobriment de biomarcadors clínics. Es van utilitzar ratolins LDL^{-/-} (*Jackson Laboratory*) de 10 setmanes d'edat per obtenir els valors basals (n= 8) i es van fer 3 grups d'estudi diferents per veure l'efecte de les dietes: dieta 1, dieta estàndard de manteniment (n= 16); dieta 2, dieta estàndard de manteniment amb un suplement de 0.20% d'oli de palma (n= 16); i dieta 3, dieta estàndard de manteniment amb un suplement de 0.20% d'oli de palma i 0.25% (w/w) de colesterol (n= 16). En cada grup d'estudi es van fer dos subgrups (n= 8 per grup d'estudi), depenen de les setmanes de tractament dels animals: 1) 16 setmanes d'edat (6 setmanes de tractament; i 2) 32 setmanes d'edat (22 setmanes de tractament). Per l'estudi metabolòmic es van utilitzar els protocols de treball posats a punt amb mostres hepàtiques d'aquest mateix model (Annex 3). Es va realitzar la identificació de 55 metabòlits en la quantificació individual dels metabòlits presents en l'extracte aquós i l'extracte de lípids de cada mostra. Vam poder establir que el colesterol de la dieta incrementa les concentracions hepàtiques de colesterol, triglicèrids, i àcid oleic però que a la vegada disminueix la el ratio PUFA/MUFA i la quantitat d'àcids grassos de cadena llarga poliinsaturats al fetge. Aquest efectes en el metabolisme del lípids van acompanyats de variacions en les concentracions hepàtiques de taurina, glutatió, metionina, i carnitina. Amb anàlisis de correlacions vam poder confirmar que la inflamació hepàtica es correlaciona amb les senyals de ressonància magnètica nuclears corresponents al colesterol i que el grau d'esteatosi es correlaciona amb les senyals de ressonància magnètica nuclear corresponent als triglicèrids.

Amb aquestes dades vam concloure que 1) el colesterol de la dieta és un factor implicat en el desenvolupament de l'esteatosi i la inflamació hepàtica i 2) de entre tots el metabòlits estudiats en l'esteatosi hepàtica d'aquest model en destaquen la disminució dels nivells de PUFA (ARA, EPA, DHA) i l'augment dels nivells de MUFA amb la conseqüent disminució del quocient PUFA/MUFA, i la disminució en la concentració de taurina, glutatió, carnitina i metionina, i que ens fan concloure que 3) els mecanismes involucrats en el desenvolupament i progressió d'esteatosi hepàtica en aquest model estan relacionats amb l'empitjorament de la funció mitocondrial, i particularment amb les variacions del metabolisme normal d'àcids grassos i 4) en l'esteatosi hepàtica d'aquest model els processos de metilació i sulfuració estan alterats

No hem d'oblidar que aquest estudi es va plantejar com a base per l'estudi de la implicació de MCP-1 en les vies metabòliques involucrades en el desenvolupament de l'esteatosi hepàtica. És per això, que un cop establerts els metabòlits implicats en l'esteatosi hepàtica i determinades les vies metabòliques involucrades en el model LDLr^{-/-}, s'ha realitzat un anàlisi metabolòmic del teixit hepàtic, idèntic al presentat en aquest treball, en el model deficient en MCP-1^{-/-}LDLr^{-/-} i que ha estat complementat amb l'anàlisi de l'expressió dels gens més destacats en el control de l'homeòstasi energètica i lipídica. Els resultats d'aquest estudi s'estan treballant per l'elaboració d'un manuscrit on es confirma que la deficiència de MCP-1 en aquest model preveu l'aparició d'obesitat i esteatosi hepàtica induïda per la dieta. Aquestes conclusions ens van fer plantejar la creació d'un nou model animal totalment oposat, el model que pugui sobre-expressar MCP-1, tant a nivell general com a nivell específic de teixit.

Metabolomic Assessment of the Effect of Dietary Cholesterol in the Progressive Development of Fatty Liver Disease

Maria Vinaixa,^{*,†} Miguel Ángel Rodríguez,[†] Anna Rull,[‡] Raúl Beltrán,[‡] Cinta Bladé,[†]
Jesús Brezmes,[†] Nicolau Cañellas,[†] Jorge Joven,[‡] and Xavier Correig[†]

Metabolomics Platform, CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Avda. Països Catalans 26, 43007 Tarragona, Spain, and Centre de Recerca Biomèdica, Hospital Universitari Sant Joan de Reus, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, c/Sant Joan s/n, 43201 Reus, Spain

Received December 28, 2009

Nonalcoholic fatty liver disease is considered to be the hepatic manifestation of metabolic syndrome and is usually related to high-fat, high-cholesterol diets. With the rationale that the identification and quantification of metabolites in different metabolic pathways may facilitate the discovery of clinically accessible biomarkers, we report the use of ¹H NMR metabolomics for quantitative profiling of liver extracts from LDLr^{-/-} mice, a well-documented mouse model of fatty liver disease. A total of 55 metabolites were identified, and multivariate analyses in a diet- and time-comparative strategy were performed. Dietary cholesterol increased the hepatic concentrations of cholesterol, triglycerides, and oleic acid but also decreased the [PUFA/MUFA] ratio as well as the relative amount of long-chain polyunsaturated fatty acids in the liver. This was also accompanied by variations of the hepatic concentration of taurine, glutathione, methionine, and carnitine. Heat-map correlation analyses demonstrated that hepatic inflammation and development of steatosis correlated with cholesterol and triglyceride NMR derived signals, respectively. We conclude that dietary cholesterol is a causal factor in the development of both liver steatosis and hepatic inflammation.

Keywords: dietary cholesterol • ¹H NMR spectroscopy • liver steatosis • LDLr-deficient mice • metabolomics quantitative profiling • NASH

1. Introduction

The liver is the major metabolic organ that performs a variety of biochemical functions necessary for whole-body metabolic homeostasis. It is sensitive to many pathological insults leading to an array of different clinical signs and symptoms. In particular, nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most common cause of liver dysfunction characterized by fatty infiltration of the liver in the absence of alcohol abuse. NAFLD is currently considered the hepatic manifestation of metabolic syndrome and other related metabolic derangements such as obesity, insulin resistance, hypertension, and dyslipidemia.^{1–3}

NAFLD ranges from simple steatosis to nonalcoholic steatohepatitis (NASH), in which inflammation is present.^{4–7} Although steatosis is considered a relatively benign and reversible condition, the progression from steatosis toward NASH represents a critical step in the progression toward more harmful conditions including fibrosis, cirrhosis, or liver cancer.^{1,8}

The actual risk factors that drive hepatic inflammation during the progression from steatosis to NASH remain unknown, although inflammatory, oxidative, and infectious cellular insults have been previously implicated.^{6–9} Experimental studies in

several animal models of hepatic steatosis demonstrate a direct relationship between dyslipidemia and dietary cholesterol with the development of liver injury.^{10,11} It has been generally accepted that hepatic steatosis is the critical first step and prerequisite for development of hepatic inflammation.⁶ However, recent evidence have raised doubts about this hypothesis. Dietary cholesterol, rather than hepatic steatosis, may be a risk factor for NASH development in hyperlipidemic mouse models.¹² Therefore, the characterization of the metabolic events in the etiology of progression from steatosis to NASH might provide a better knowledge-base to understand the exact mechanisms underlying such progression and to predict as well as prevent further complications.

In this regard, metabolomics is a highly valuable tool because it can provide a holistic evaluation of low molecular weight compounds present in hepatic tissue of animal models indicating a particular biochemical phenotype.¹³ The utility of the so-called fingerprinting NMR-based metabolomics approach in the analysis of liver tissue extracts has already been demonstrated.^{13–18} However, most of these works report their findings upon a statistical comparison of samples based on spectral patterns or statistically relevant NMR spectral signatures. Currently, there is an emerging and growing preference for using quantitative metabolic profiling as it offers a number of important advantages over existing fingerprinting methods.¹⁴ Profiling studies can be either holistic or targeted and quantita-

* To whom correspondence should be addressed. Maria Vinaixa. E-mail: maria.vinaixa@urv.cat. Tel: +34-977256587. Fax: +34-977559605. Website: www.metabolomicsplatform.com.

[†] CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas.

[‡] Hospital Universitari Sant Joan de Reus.

tive or semi-quantitative. A targeted metabolic profiling focuses on a group or category of metabolites of interest defined a priori. It involves the quantification or semi-quantification of such group of metabolites using an analytical methodology specifically developed for such purposes. When no a priori assumptions on metabolites describing the biological phenomena under study are made, a holistic or global profiling methodology can be attempted. Then, data are acquired by high-throughput generic analytical methods under certain analytical conditions. When referring to NMR spectroscopy, holistic quantitative profiling is based on the deconvolution of resonances in each NMR spectrum into a list of metabolites and their associated concentrations obtained by properly matching and fitting the reference peaks to the sample peaks.^{14,19,20}

In the current study, we have performed a NMR-based metabolomics study to investigate the metabolic effects of the dietary cholesterol in the etiology of progression from hepatic steatosis to NASH. A comparative study based on a nutritional intervention in male LDLr^{-/-} mice on a C57BL/6J background was designed according to previous data.^{11,13,21} At 10 weeks of age, animals were assigned to three dietary groups, chow diet, high-fat diet and high-fat, high-cholesterol diet. At baseline (10 weeks of age), 16- and 32-week time point variables were analyzed and the metabolic rearrangements in the diet-and time-dependent progression from steatosis to NASH were assessed in liver tissue extracts using ¹H NMR spectroscopy.¹³ We have attempted a holistic metabolomics quantitative profiling study performing a quantification of individual metabolites present in aqueous and lipidic liver extracts analyzed by ¹H NMR spectroscopy. In addition, we have submitted this quantification to unsupervised multivariate analysis obtaining a combination of biochemical markers that characterize the metabolome changes in the progressive development of fatty liver disease induced by the addition of dietary cholesterol. We reasoned that the identification and quantification of metabolites might facilitate downstream pathways and network analyses and, therefore, may lead to drawing specific conclusions and formulating testable hypothesis.

2. Materials and Methods

2.1. Experimental Animals and Laboratory Procedures. All animal studies were carried out under appropriate guidelines according to the code of conduct of Animal Care Committee of the Universitat Rovira i Virgili and previously published results.²¹ Mice were housed at constant room temperature (22 °C), air humidity (55%), and a light/dark cycle of 12 h. Water and food (14% protein rodent maintenance diet, Harlan, Barcelona, Spain) were given *ad libitum*.

A comparative study was designed with male LDLr^{-/-} mice on a C57BL/6J background, which were the progeny of mice purchased from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). The animals were allocated to experimental groups by computer-generated randomization schedules and investigators responsible for the assessment of outcomes had no knowledge of the experimental group to which the animals belonged. Mice were maintained under a normal chow diet for 10 weeks. At 10 weeks of age, four animals were sacrificed, and plasma and liver tissue samples were obtained. The remaining littermates were assigned to three dietary groups (*n* = 8 each) and maintained under the same regime condition until 16 and 32 weeks of age where plasma and liver tissue samples were taken in four animals from each group. Chow diet (considered the control

diet) is the same as the maintenance diet (3% fat by weight, 0.03% cholesterol). The second diet, which was high-fat, was commercially prepared with the addition of palm oil to diet 1, providing a source of fat (20% w/w) that provides equal amounts of saturated (42.5%) and monounsaturated (43.4%) fat (PF 1973, Mucedola, Harlan, Barcelona, Spain). Finally, a third diet was prepared with the addition of cholesterol (0.25% w/w) to diet 2 to resemble some of the characteristics of the Western-type diet (PF 1973/A, Mucedola, Harlan, Barcelona, Spain). Diets were prepared and labeled by an independent investigator according to the randomization schedule to ensure allocation concealment. There were no animals excluded from analysis.

Body weight was monitored weekly. Plasma cholesterol and triglyceride concentration were determined by standard laboratory procedures.¹⁰ The liver-tissue content of cholesterol and triglycerides was determined after lipid extraction with isopropyl alcohol-hexane method.²² Liver histological examination was performed to measure the lipid droplet content (percentage of lipid droplet area/cell) using the AnaliSYS system (Soft Imaging System, Münster, Germany). The amount of inflammation and the degree of steatosis were estimated as previously described.^{22,23} Oil Red O stains were prepared using reagents from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). The hepatic proportion of macrophages (anti-F4/80, Serotec, Oxford, UK) was determined by immunohistochemistry. For each individual mouse, 30 fields from each of three different sections were analyzed.²¹ For the assessment of atherosclerosis, hearts and regions 2 mm below the ascending aorta were removed, cut transversely, embedded in OCT, and immediately flash-frozen. Aortic valve leaflets were used as an anatomic reference point. Pathological evaluation and quantitative measurements were performed as previously described²⁴ using the image analysis software AnaliSYS.

2.2. Liver Extraction Procedures for ¹H NMR Based Metabolomics Assays. Liver extraction was performed following the procedure described by Shi et al.²⁵ with slight modifications.¹³ A portion of hepatic tissue (~50 mg) was removed, flash-frozen, and mechanically homogenized using the Precellys24 instrument in 1 mL of H₂O/CH₃CN (1/1). The homogenates were centrifuged at 5000 × *g* for 15 min at 4 °C. Supernatants (hydrophilic metabolites) and pellets (lipophilic metabolites) were separately lyophilized overnight to remove water for NMR experiments and stored at -80 °C until further analysis. For NMR measurements, the hydrophilic extracts were reconstituted in 600 μL D₂O containing 0.67 mM trisilylpropionic acid (TSP). The lipophilic extracts were subsequently extracted in 700 μL of a solution CDCl₃/CD₃OD (2:1) containing 1.18 mM tetramethylsilane (TMS) and then vortexed, homogenized for 20 min, centrifuged for 15 min at 6000 × *g* at room temperature, and transferred into 5-mm NMR glass tubes.

2.3. ¹H NMR Measurements. One- and two-dimensional ¹H NMR spectra were measured at a 600.20 MHz frequency using an Avance III-600 Bruker spectrometer equipped with an inverse TCI 5 mm cryoprobe. For 1D aqueous extract spectra, a one-dimensional (1D) nuclear Overhauser effect spectroscopy with a spoil gradient (noesygp1d) was used. Solvent presaturation with low irradiation power (10 Hz) was applied during recycling delay and mixing time (*t*_m = 100 ms) to suppress residual water. A total of 256 transients of 12 kHz of spectral width were collected at 300 K into 64 k data points, and exponential line broadening of 0.3 Hz was applied before Fourier transformation. A recycling delay time of 8 s was

applied between scans to ensure correct quantification. In the case of lipophilic extracts, a 90° pulse with presaturation sequence (zgpr) was used. We performed measurements at 287 K, shifting the residual water signal to 4.65 ppm to allow the quantification of the characteristic glycerol-backbone signals. Besides, residual water was presaturated during recycling delay (RD = 8 s) using a low irradiation power (10 Hz). A total of 256 FIDs of 12 kHz of spectral width were collected into 64 k data points and exponential line broadening of 0.3 Hz was applied before Fourier transformation. The frequency spectra were phased, baseline corrected, and then calibrated (TMS or TSP, 0.0 ppm) using TopSpin software (version 2.1, Bruker).

2.4. Metabolite Identification and Quantification. Resonance assignments were done on the basis of literature values^{26–33} and different database search engines (BBioRef AMIX database, Bruker and HMDB). Chemical shifts were identified as described elsewhere.^{27,29,30,34} Both a two-dimensional (2D)-¹H,¹³C- HSQC (heteronuclear single quantum correlation) and a two-dimensional (2D)-¹H–¹³H COSY (correlation spectroscopy) were used for structural confirmation. The one-dimensional S-TOCSY (Statistical Total Correlation Spectroscopy) approach³⁵ was also used to elucidate some of these assignments.

After baseline correction, selected peaks in the 1D-NMR spectra were integrated using the AMIX 3.8 software package (Bruker, GmBH). The absolute concentration of single metabolites either in water-soluble or lipid extracts was assessed according to the methodology described by Serkova et al.³⁶ The integral at 0.87 corresponding to ω -CH₃ was used as a reference for total fatty acid chains to estimate the molar percentage of fatty acid signals.

A list of metabolites identified in ¹H NMR lipidic and aqueous liver extracts that have been integrated and further used to assess metabolic rearrangements produced by progressive development of fatty liver disease is summarized in Table 1.

2.5. Data Processing and Multivariate Analysis. Absolute concentrations derived from both lipophilic and hydrophilic extracts were arranged together in one single data matrix, which was used as the input matrix for the PCA multivariate model. Previously, data were scaled to unit variance to give all the identified metabolites the same opportunity to enter to the model. Data (pre-) processing, data analysis, and statistical calculations were performed with Matlab (Matlab version 6.5.1, Release 13, The Mathworks, 2003 and the PLS Toolbox, version 4.2). For ¹H NMR correlation heat-maps and S-TOCSY calculation, a Matlab in-house script based on Cloarec et al.³⁵ was used.

3. Results

3.1. Course of Liver Steatosis in the Animal Model. A summary of relevant changes in this model under different dietary conditions is depicted in Figure 1. Mean body weight increased in an age- and diet-dependent manner, and the maximal differences were observed from the high-fat, high-cholesterol diet at the end of dietary treatment (Figure 1A). These changes were paralleled by significant increases in plasma cholesterol and triglyceride concentrations (Figure 1B, C), significantly apparent in mice on the high-fat, high-cholesterol diet at the 32-week time point. For descriptive purposes, this model develops significant atherosclerosis (Figure 1D) that is closely linked to hyperlipidemia and other metabolic disturbances. At 16 weeks of age, the atherosclerotic

lesion size was not detectable in animals fed the chow diet and was minimal in mice fed high-fat diet, high-cholesterol diets. At 32 weeks of age, the plaque progression increased in mice fed high-fat diets with respect to controls, although the differences in lesion size were only significant in animals fed on the high-fat, high-cholesterol diet. In the liver, the intake of a high-fat diet produced inflammation and steatosis (Figure 1E, F), an effect clearly evident when there was a supplementation of cholesterol to the diet. However, when the infiltration of inflammatory cells in the liver was measured as the hepatic presence of F4/80 cells, there were minimal differences among dietary treatments (Figure 1G). Dietary cholesterol significantly increased the hepatic cholesterol concentration at both the 16- and 32-week time point (Figure 1H). This trend was also observed in the hepatic triglyceride content, although it did not reach statistical significance (Figure 1I). Hepatic neutral lipid storage was also confirmed by examining the amount of Oil red O stained cells (Figure 1J–L).

3.2. Analysis of ¹H NMR Spectroscopic Profiles of Liver Extracts. Aqueous extracts ¹H NMR profiles of liver from mice underwent a chow diet were markedly different to those in a high-fat, high-cholesterol diet (Supplementary Figure S1, Supporting Information). ¹H NMR spectrum of aqueous soluble liver tissue extracts shows resonances mainly associated with low molecular weight metabolites such as amino acids and related compounds, glucose, lactate, nucleotides, intermediate metabolites, and soluble membrane components, such as choline. ¹H NMR spectra of the lipophilic extracts are composed of several dominating regions with major peaks attributable to double bonds mainly from protons belonging to di- or tri-acylated glycerols, the phospholipids polar head groups, methylene and methyl groups of the fatty acyl chains, and methyl cholesterol. The spectra allowed a detailed assignment of unsaturated fatty acyl moieties from components such as phospholipids and triglycerides (Supplementary Figure S2, Supporting Information).

¹H NMR resonance assignments with chemical shifts, multiplicity, and J-coupling constants of the signals elucidated in ¹H NMR spectra of both the water and lipid-soluble mice liver extracts are shown in Table 1.

3.3. Diet- and Time-Dependent Metabolic Changes Associated with Gradual Development of Liver Steatosis and Inflammation. Multivariate PCA analysis in a strategy designed to compare diets were initially performed on the data derived from metabolites quantification at either 16 or 32 weeks of age. Supplementary Figure S3 (A, B, Supporting Information) shows the scatter scores and loading plots for these two PCA models. The PCA scores plot at 16 weeks of age revealed a distinct mice group clustering trend according to their dietary manipulation along PC1, which accounts for a 37% of total variation within the data matrix (Figure 2A). Along PC1, samples appeared gradually arranged according to the presence of hepatic lesions. This was minimal in mice fed on the chow diet at 10 weeks of age, which had positive PC1 values and were considered as baseline. Those mice fed with the cholesterol supplemented diet characteristically showed negative values of PC1 and presented significant hepatic lesions. Thus, moving along PC1 from positive to negative values, liver damage produced by different dietary conditions appears progressive. At the 16-week time point, hepatic inflammation was evident in all groups, especially in mice fed on cholesterol supplemented diets, and steatosis was considered incipient for mice fed on high-fat, high-cholesterol diets. Conversely, at 32 weeks of age, steatosis

Table 1. ^1H NMR Resonance Assignments with Chemical Shifts, Multiplicity, and J -Coupling Constants for Signals Identified in Water and Lipid-Soluble Extracts^a

code	metabolite	δ (^1H shift) ppm	# protons	moieties assignment	multiplicity
Water-soluble metabolites					
1	Glucose-6-Phosphate (q)	5.23 + 4.64	1(C- α) + 1(C- β)	HC- α + HC- β	d + d
2	Glucose-1-Phosphate-(Glycogen) (q)	5.49	1	C1-H	m
3	UDPG (q)	7.96	1	H6-ring	d (8.2)
4	Pyruvate (q)	2.40	3	CH ₃ -CO-	s
5	3-hydroxybutyrate (q)	1.20	3	CH ₃ -CHO-	d (6.20)
6	Lactate (q)	4.11	1	α CH	q (7.0)
7	Fumarate (q)	6.52	1	CH=	s
8	Free glycerol (q)	3.65	2=1(C1) + 1(C3)	CH ₂ -OH	dd (7.4, 4.4)
9	NAD/NADP/NADPH (q)	8.25	1	H4-ring nicotinamide	m
10	ATP/ADP/AMP (q)	8.34	1	H2-ring adenine	s
11	UTP/UDP/UMP (q)	7.87	1	H6-ring	d (8.10)
12	Uracil (q)	5.80	1	ring C5-H	d (7.70)
13	Carnitine (q)	4.58	1	β (CH)-OH	s
14	Cholines (q)	3.20	9	(CH ₃) ₃ -N	s
15	Acetates (q)	1.91	3	CH ₃ -CO	s
16	Ascorbic acid (q)	4.50	1	C4-H	d (2.0)
17	Leucine (q)	0.96	6	γ (CH ₃) + γ (CH ₃)	t (6.40, 6.40)
18	Valine (q)	1.04	3	γ (CH ₃)	d (4.40)
19	Alanine (q)	1.48	3	β (C H ₃)	d (7.20)
20	Isoleucine (q)	1.01	3	γ (CH ₃)	d (7.0)
21	Lysine (q)	1.72	2	δ (CH ₂)	m
22	Glutamine (q)	2.45	2	γ (CH ₂)	m (broad)
23	Glutamate (q)	2.35	2	γ (CH ₂)	m (broad)
24	Methionine (q)	2.64	2	γ (CH ₂)	t (7.3, 7.3)
25	Phenylalanine (q)	7.38	5	H2-H6 ring	m (broad)
26	Threonine (q)	4.25	1	β (CH)	m
27	Tyrosine (q)	6.90	2	H3, H5 ring	d (8.50)
28	Histidine (q)	7.06	1	H4-ring	s
29	Taurine (q)	3.26	2	CH ₂ -N	t (6.80, 6.80)
30	Glutathione (oxidized) (q)	2.55	4	γ (CH ₂) Glu	m
31	Creatine (q)	3.04	3	N-CH ₃	s
32	Creatinine (q)	3.05	3	N-CH ₃	s
Lipid-soluble metabolites					
1	Total Cholesterol (q)	0.69	3	C18-H ₃	s
2	Free Cholesterol (q)	1.02	3	C19-H ₃	s
3	Esterified Cholesterol (q)	1.04	3	C19-H ₃	s
4	Total Cholesterol	0.86	3 (+3)	C26/27-H ₃ (one of the doublets is embedded in 0.88 triplet signal arising from ω -CH ₃)	2 \times d
5	Total Cholesterol	0.92	3	C21-H ₃	d (6.6)
6	Triglycerides	4.17	2	Glycerol (C1-H ^u) and (C3-H ^u)	dd (11.8,6.1)
7	Triglycerides	4.34	2	Glycerol (C1-H ^d) and (C3-H ^d)	dd (12.1,4.1)
8	Triglycerides (q)	5.29	1	Glycerol (C2-H)	q (5.1)
9	Diglycerides	3.69	2	Glycerol (C3-H ₂). C-3 position is not acylated, then C-3 has fast free rotation leading to a doublet.	d (5.2)
10	Diglycerides	4.38	1/2 (+1/2)	Glycerol (C1-H ^d) (The other proton (H ^u) attached to C1 remains embedded inside 4.34 dd). Only a doublet of dd is visible	d (5.3)
11	Diglycerides (q)	5.10	1	Glycerol (C2-H)	m
12	Monoglycerides	2.29	2	FA α H -CH ₂ -CO-O-C2	t (7.5)
13	Monoglycerides	3.72	4, 2 + 2	Glycerol (C1,3-H ₂) acylated in pos C-2	t(5.2)
14	Monoglycerides (q)	4.89	1	Glycerol (C2-H) acylated in pos C-2	q (5.1)
15	Total phospholipids	4.01	2	Glycerol (C3-H ₂)	m (broad) two overlapping pairs of quartets
16	Total phospholipids (except lysophosphatidylcholine)	4.42	1 (+1)	Glycerol (C1-H ₂) (The other proton attached to C1 remains embedded inside 4.34 position)	m
17	Total phospholipids (except lysophosphatidylcholine) (q)	5.24	1	Glycerol (C2-H)	quartet of doublets

Table 1 Continued

code	metabolite	δ (H^1 shift) ppm	# protons	moieties assignment	multiplicity
18	Phosphatidylcholine	3.22	9	$-\text{CH}_2-\text{N}-(\text{CH}_3)_3$	s
19	Phosphatidylcholine (q)	3.60	2	Alkyl-PC (Phosphoether) $\text{CH}_2-\text{N}-(\text{CH}_3)_3$	m
20	Phosphatidylethanolamine (q)	3.11	2	Alkyl-PE (Phosphoether) $\text{R}-\text{PO}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{N}^+\text{H}_3$	m
21	Phosphatidylinositol (q)	3.79	1	Inositol cycle $6' -\text{CH}-\text{OH}$	t (9.5)
22	Phosphatidylserine (q)	6.67	3	$\text{NH}_3^+-\text{CH}-\text{COO}$	m
23	Phosphatidylglycerol	3.59	2	C-3' CH_2-OH	dd
24	Lysophosphatidylcholine	3.87	2	C-3 CH_2-OP	m
25	Lysophosphatidylcholine (q)	4.12	2	C-1 CH_2-OC	m
26	Sphingomyelin	3.21	9	$-\text{CH}_2-\text{N}-(\text{CH}_3)_3$	s
27	Sphingomyelin (q)	5.68	1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n-\text{C}^b\text{H}=\text{C}^a\text{H}-\text{C}^1\text{HOH}-\text{C}^2\text{HN}-\text{C}^3\text{H}_2-\text{O}-\text{P}$	m
28	Plasmalogen (q)	5.92	1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n-\text{C}^b\text{H}=\text{C}^a\text{H}-\text{C}^1\text{H}_2\text{OR}-\text{C}^2\text{HOCO}-\text{C}^3\text{H}_2\text{O}-\text{P}$	d (6.7)
29	FA, ω - CH_3	0.88	3	FA chain $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$	t (6.90)
30	ω -3, (DHA+ EPA+ linolenic) (q)	0.98	3	ω -3 $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{C}=\text{C}$	t (7.50)
31	FA, (Total Fatty acyl chains)	1.30	2	FA chain $-(\text{CH}_2)_n-$	m
32	FA, βH_2	1.62	2	βH_2 $\text{R}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}-\text{OR}$	m
33	FA, ARA+EPA	1.70	2	βH_2 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{CO}-\text{OR}$	m
34	FA, OLEIC (q)	2.02	4	$-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$	m
35	FA, ARA+EPA (q)	2.12	2	γH_2 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{CO}-\text{OR}$	m
36	FA, αH_2	2.35	2	αH_2 $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{OR}$	m
37	FA, DHA (q)	2.41	4	αH_2 and βH_2 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{OR}$	m
38	FA, LINOLEIC (q)	2.78	4	$-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_n$, $n = 1$	t (6.4)
39	FA, PUFA (q)	2.85	2	$-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_n$, $n \geq 2$	m
40	FA, MUFA (with PUFA) (q)	5.36	2	$-\text{CH}=\text{CH}-$	m

^a In water-soluble extracts, only quantitative signals are indicated. Subscript (**q**) indicates signals used for quantitative purposes. ARA, arachidonic acid; DHA, docosahexaenoic acid; EPA, eicosapentaenoic acid; PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanolamine; SM, sphingomyelin; FA: fatty acid chain. s = singlet; d = doublet; dd=double doublet; t = triplet; q = quartet; m = multiplet.

clearly increased, and the PCA model did not show such a gradual separation on the three different diets (Supplementary Figure S3B, Supporting Information). PC1 gathering the highest variance is rather discriminating among baseline and 32 weeks of age mice regardless of the dietary manipulation intervention. However, mice fed the cholesterol-supplemented diet were clearly differentiated along PC2, which explained 22% of the total variation (Figure 2B). To assess the metabolites putatively implicated in the variations observed in inflammation and steatosis through the progressive lesions induced by dietary modification, we have studied the loadings bar plots of PC1 at 16 weeks of age (Figure 2A) and PC2 at 32 weeks of age (Figure 2B). Metabolites accounting for higher absolute value in the loadings bar plot exert higher influence in the PCA model. Data are also color-coded according to significance determined by a Kruskal–Wallis test ($p < 0.05$). Gray bars indicate that their corresponding metabolites are significantly different among the dietary groups entering the PCA model. Thus, at the 16-week time point, when steatosis is not yet fully developed, livers from mice fed the cholesterol supplemented diet presented significantly raised levels of free and esterified cholesterol as well as triglycerides and oleic acid in comparison to their counterparts on cholesterol free diets. However, mice undergoing lower levels of hepatic lesions, inflammation and steatosis score (baseline and chow diet mice), which are characterized for positive values of PC1, presented depleted levels of triglycerides and total cholesterol but increased hepatic levels of PUFA (ω -3

fatty acyls, docosahexaenoic 22:6(n-3) (DHA), arachidonic 20:4(n-6) (ARA) + eicosapentaenoic 20:5(n-3) (EPA), and PUFA/MUFA and PC/PE ratios. These changes were paralleled by increased levels of metabolites such as free glycerol, lactate, G-6-P, carnitine, taurine, glutathione, and methionine, among others. At the 32-week time point, in the presence of severe steatosis and clear evidence of hepatic lesions, mice fed the cholesterol supplemented diet showed significantly higher levels of triglycerides, free and esterified cholesterol, oleic acid, and some amino acids, such as leucine, valine, and lysine. Also, at this end time point there was a significant depletion of PUFA (ARA + EPA, DHA, and linoleic) and carnitine levels, among others.

3.4. Characterization of Differential Metabolite Patterns Associated with Liver Steatosis and Inflammation. The actual concentration of the 55 metabolites identified and segregated by dietary condition and time of observation is shown in Supplementary Table S1 (Supporting Information). For comparison, baseline values are also included and significant changes between chow and high-fat or high-fat supplemented cholesterol diets (Mann–Whitney U test, $p < 0.05$) are indicated. Of note, dietary cholesterol significantly raises the levels of total hepatic cholesterol and triglycerides at both the 16- and 32-week time points (Figure 3A, B). Additionally, the levels of MUFA were increased significantly at the expense of PUFA, resulting in a significantly decreased PUFA/MUFA ratio (Figure 3C) that correlated with hepatic lesions.

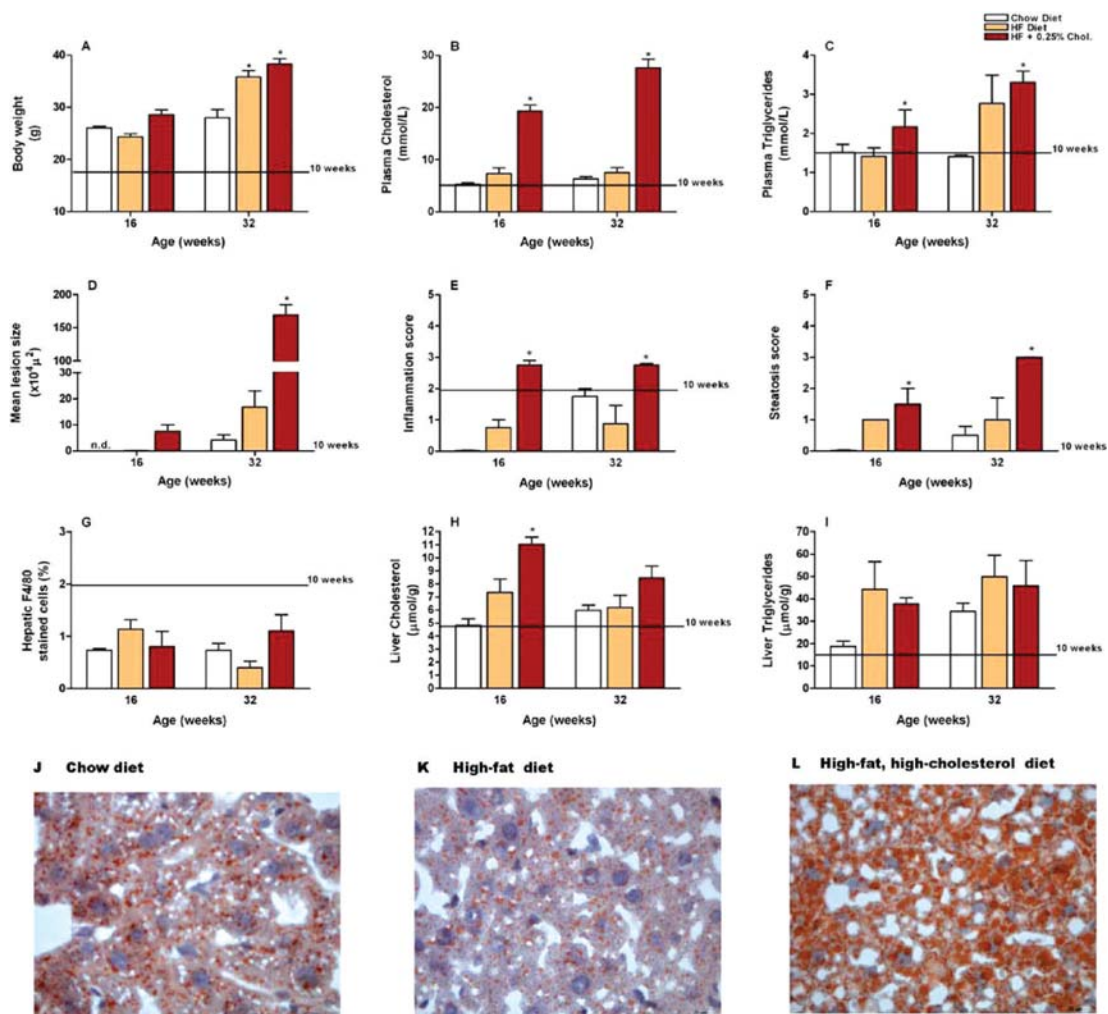


Figure 1. High-fat, high-cholesterol diets elicited metabolic changes in LDLr^{-/-} mice. There was a significant increase in body weight (A), hyperlipidemia (B, C), and arteriosclerosis progression (D). The influence of diet is also evident in the liver as indicated by the measurement of inflammation (E), the degree of steatosis (F), and the infiltration of inflammatory cells (G). These effects were accompanied by an increased accumulation of cholesterol and triglycerides in the liver (H, I), confirmed histologically by Oil Red O staining (J–L) from which a representative microphotograph of each diet is shown at the 32-week time point. Values are mean ± SD * $p < 0.05$ with respect to controls.

Fatty acyl chain composition was analyzed and represented in terms of molar percentages, in both time points (Figure 3D, E). Dietary cholesterol seems to be responsible for a significant increase in the proportion of oleic acid and a significant clearance of long chain polyunsaturated fatty acids such as ARA, EPA, and DHA.

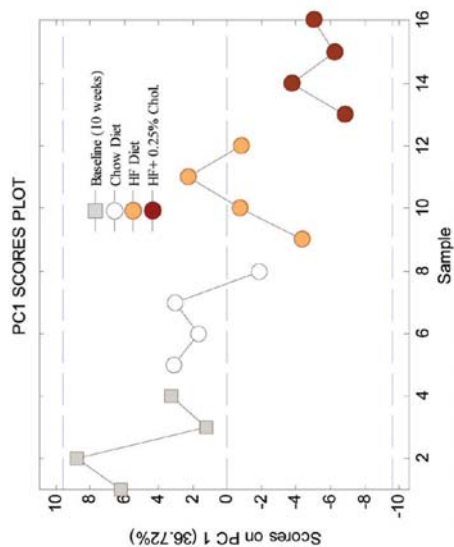
The hepatic concentrations of taurine, glutathione, carnitine, and methionine were also decreased with respect to baseline values (Figure 4). At 16 weeks of age, the hepatic taurine, glutathione, and carnitine levels (Figure 4A, B, C) were significantly decreased for those mice fed a cholesterol enriched diet when compared to their chow diet counterparts.

Finally, heat-map correlations of lipid-soluble ¹H NMR spectra with inflammation and steatosis (Figure 5) demonstrate that the inflammation score correlates with dietary cholesterol as this is observed in all resonances from different proton nuclei belonging to cholesterol molecules (Figure 5A). Although cholesterol also contributes to the steatosis score, this is mainly correlated with the triglyceride NMR-derived signals (Figure 5B).

4. Discussion

Our data indicate that dietary cholesterol has a profound impact in the composition of fatty acids in the liver. In

A. PCA ANALYSIS AT 16 WEEKS OF AGE



B. PCA ANALYSIS AT 32 WEEKS OF AGE

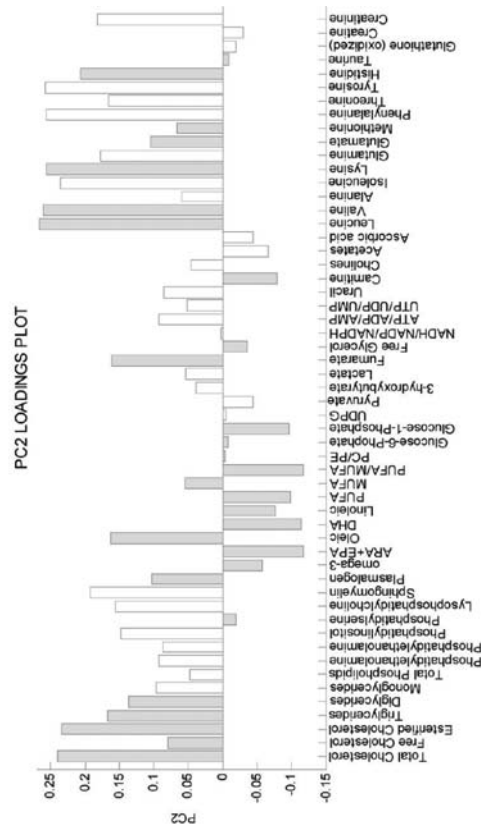
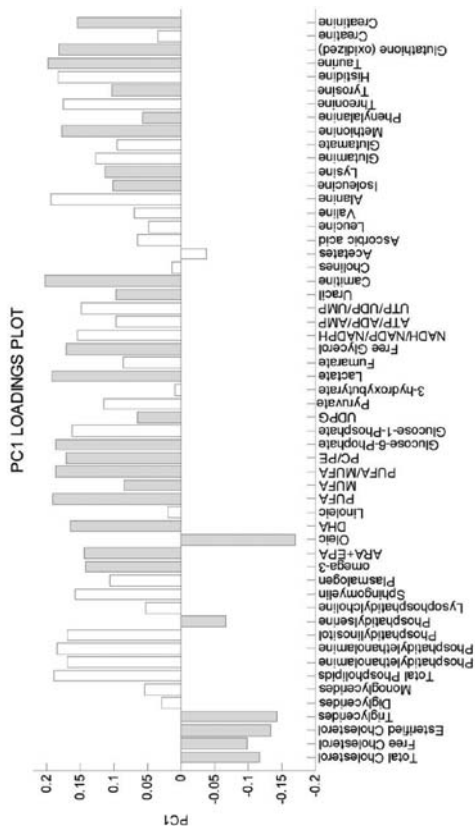
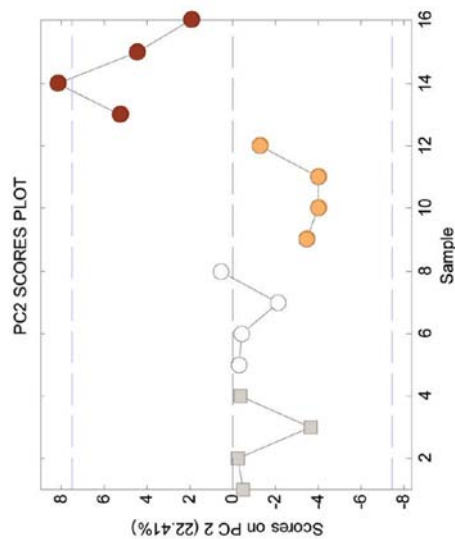


Figure 2. Principal component analyses (PCA) based on the metabolic patterns obtained from aqueous and lipophilic liver tissue extracts at 16 (A) and 32 weeks of age (B). The PCA scores plot showed an important separation of clusters according to dietary intervention which was more evident at 16 weeks of age. A PCA loadings plot revealed the metabolites implicated in the induced hepatic lesions. Gray bars indicate which metabolites are significantly different among the dietary groups based on a Kruskal–Wallis test ($p < 0.05$).

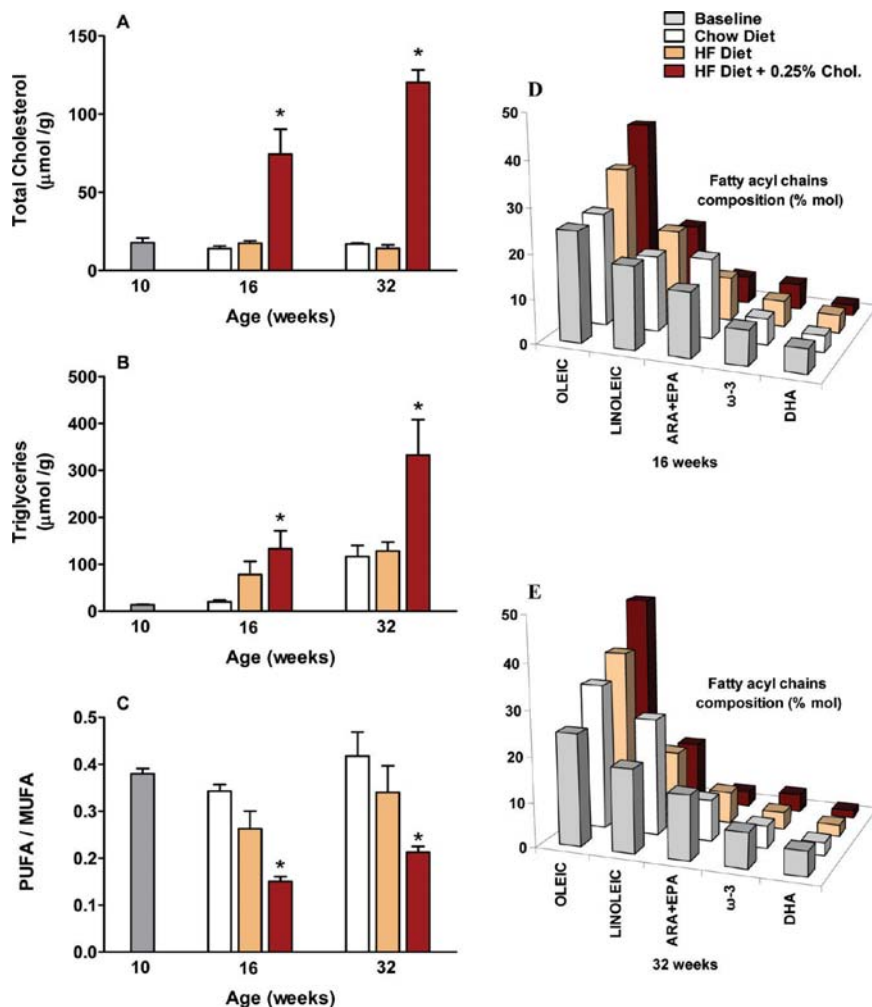


Figure 3. Dietary cholesterol elicited metabolic changes in lipid-soluble metabolites associated with liver steatosis and inflammation. A significant increase in hepatic cholesterol (A) and triglyceride (B) content was detected whereas the PUFA/MUFA ratio (C) was decreased in mice fed high-fat diets. The effect of dietary cholesterol was also evident in the fatty acyl chain composition (D, E). There was a significant increase in the hepatic proportion of oleic acid, although decreased ARA, DHA, EPA, and ω -3 content was detected.

particular, a decreased PUFA/MUFA ratio is observed at an early stage, probably indicating excessive lipid peroxidation and oxidative stress.^{31,37} This is in accordance with previous findings obtained in obese humans with significant liver steatosis.^{5,38-40} Moreover, the significant depletion of PUFA indicates a reduction in fatty acid oxidation and triglyceride release from the liver with a consequent increase in triglyceride synthesis that may contribute significantly to the development of triglyceride accumulation in hepatocytes.⁴¹

Our dietary conditions, as shown by the relative enrichment of several fatty acids, clearly indicate variations in metabolism that suggest that 12/15 lipoxygenase (12/15LO) or related molecules may play a role in exacerbating the situation. High-fat diet-induced liver steatosis is an inflammatory condition that involves the recruitment of macrophages. Among candidate genes that regulate inflammation in tissues, it has recently

been proposed that 12/15LO is involved. Cells overexpressing 12/15LO secrete potent chemokines, mainly monocyte chemoattractant protein-1, and 12/15LO knockout mice exhibit no high-fat diet induced change in tissues.⁴² The family of 12/15LO enzymes has a relevant role in the metabolism of fatty acids. For instance, 12/15LO catalyzes the insertion of molecular oxygen in ARA resulting in a fatty acid hydroperoxide and also oxygenates linoleic acid 18:2(n-6). Free unsaturated fatty acids and fatty acids esterified in phospholipids and cholesteryl esters are substrates for 12/15LO.⁴³

We found decreased hepatic methionine concentrations respect to baseline values regardless of the dietary treatment. This is also accompanied by a significant decrease in glutathione and taurine concentrations in animals fed a high-fat, high-cholesterol diet. Both taurine and glutathione are downstream products of methionine metabolism via S-adenosyl-L-

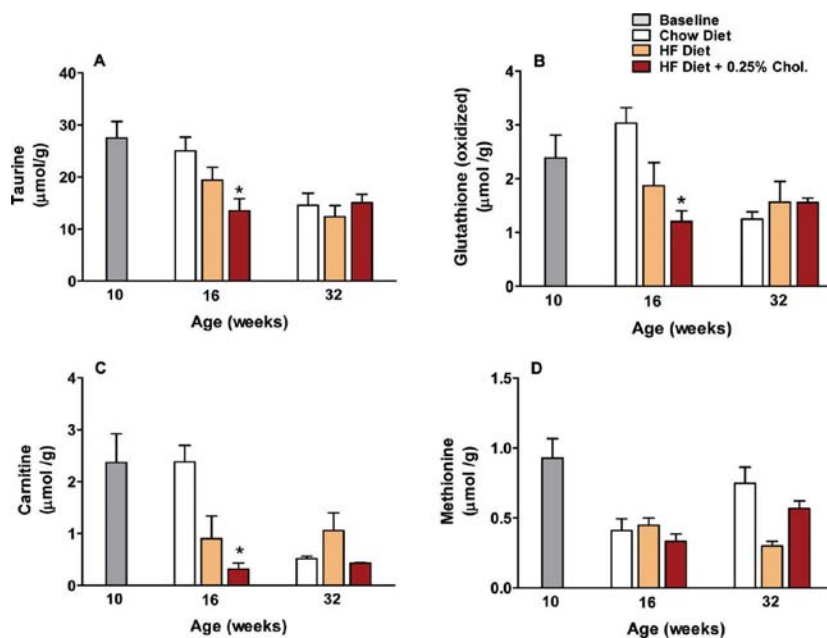


Figure 4. Representation of the most significant changes in water-soluble metabolites. Significant decreases in the hepatic taurine (A), glutathione (B), and carnitine (C) levels were observed at 16 weeks of age in mice on high-fat, high-cholesterol diet. At 16 weeks of age, hepatic methionine concentration is also decreased as compared to baseline levels in both chow diet and high-fat diets (D).

methionine (S-AdoMet) and transsulfuration pathways. Thus, the concomitant decrease of these metabolites together with methionine depletion suggests that S-AdoMet and transsulfuration pathways fluxes are probably decreased because of dietary conditions. Such a relationship is more evident with inflammation (16 weeks of age) rather than with steatosis, suggesting that dietary cholesterol may elicit a relative S-AdoMet deficiency. This may be supported by the fact that intact S-AdoMet concentrations are crucial for the critical balance of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of liver disease.⁴⁴ Our data may also be concordant with recent findings indicating that the transition from fatty liver to a more intense inflammatory condition is associated with S-AdoMet depletion in *ob/ob* mice fed a methionine and choline-deficient diet.⁴⁵ Moreover, knockout mice deficient in hepatic S-AdoMet synthesis (*MAT1A*^{-/-})⁴⁶ developed steatohepatitis associated with a significant downregulation of mitochondrial proteins (e.g., prohibitin 1, cytochrome c oxidase I and II, and ATPase b-subunit), some of them directly regulated by S-AdoMet. Additionally, hepatic taurine and glutathione depletion might also be related to other metabolic pathways. Taurine is linked to the activity of the hepatic cholesterol-7 α -hydroxylase (CYP7A1), a key enzyme in the process of cholesterol excretion and bile acid synthesis. As we previously described, a decrease in the hepatic concentration of taurine in animals fed high-fat, high-cholesterol diets could be due to increased excretion of taurine-conjugated bile acids caused by an excess of cholesterol accumulation in the liver.¹³ Likewise, the possible metabolic consequences related to glutathione depletion are also remarkable. Glutathione, the major low-molecular-weight thiol in animal cells, plays crucial roles in antioxidant defense, nutrient metabolism, and the regulation of whole-body homeostasis.⁴⁷

Depleted glutathione levels can be either attributed to increased gamma-glutamyl cycle⁴⁸ or glutathione-S-transferase activities.⁴⁹

Increased dietary cholesterol also resulted in a significant decrease of hepatic carnitine concentrations. It is well documented that the essential role of carnitine consists of the facilitation of mitochondrial import and oxidation of long chain fatty acids but that it also functions as an acyl group acceptor that facilitates mitochondrial export of excess carbons in the form of acylcarnitine. It is therefore possible that diminished carnitine reserves in the liver may be accompanied by marked perturbations in mitochondrial fuel metabolism, including low rates of complete fatty acid oxidation. Interestingly, it has been recently demonstrated that carnitine insufficiency may be caused by chronic overnutrition in mice and that this compromises not only mitochondrial performance but also metabolic control.⁵⁰

Taken together, our results suggest that dietary cholesterol is a causal factor in the development of liver steatosis, probably through an impact in the overall metabolism of fatty acids via a mitochondrial impairment. Dietary cholesterol is also causative of hepatic inflammation and consequently of associated metabolic abnormalities, indicating that dietary manipulation is critical in the clinical care.

5. Conclusions

The present work offers a proof-of-concept, where we are able to detect clear changes in metabolite levels driving hepatic inflammation to NASH using a holistic, quantitative profiling NMR-based metabolomics approach. NMR-derived quantitative data have been used for further multivariate modeling to ascertain the role of dietary cholesterol in the progression of

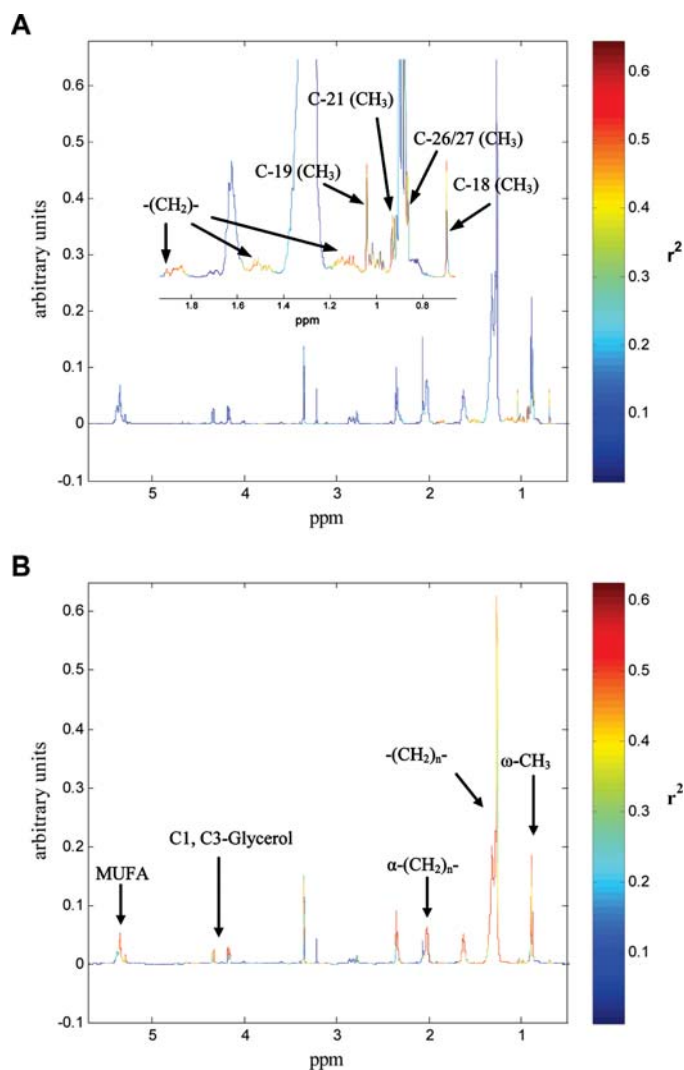


Figure 5. Heat-map correlation of lipid-soluble ¹H NMR spectra demonstrated the crucial role of dietary cholesterol in liver steatosis and inflammation. The hepatic inflammation score was correlated to all resonance related to cholesterol molecules (A) and the hepatic steatosis score was mainly correlated with triglyceride NMR derived signals (B).

fatty liver disease. This method may become a useful complementary tool in the *in vivo* mice experiments in which metabolic phenotyping is required.

Our data established dietary cholesterol as a causative factor in the development of both liver steatosis and hepatic inflammation. Analysis of the affected metabolites suggests that the mechanisms involved are related to impairment in mitochondrial function, particularly to variations in normal fatty acid metabolism. This metabolomic approach may provide information to indicate dietary modifications to modify the reversible components of the associated metabolic derangements.

Acknowledgment. This work was supported by grants PI051606 and PI08/1381 from the Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) and by CIBER de Diabetes y Enfermedades

Metabólicas (CIBERDEM). CIBERDEM is an initiative of ISCIII (Instituto de Salud Carlos III), Madrid, Spain. Anna Rull is the recipient of a fellowship from the Generalitat de Catalunya (FI-G 0503).

Supporting Information Available: Figure S1 shows a comparison between ¹H NMR spectra (600 MHz) of liver aqueous extracts from LDLr^{-/-} mice-fed chow diet and high-fat +0.25% cholesterol at 16 weeks of age. Figure S2 shows the identified metabolites in the ¹H NMR spectra (600 MHz) of liver lipidic extract from mice under high-fat +0.25% cholesterol diet at 32 weeks of age. Figure S3 shows the scores and loadings scatter plot of PCA analysis performed either at 16 and 32 weeks of ages. Table S1 summarizes the quantification of the 55 identified metabolites within the different dietary and time-

point conditions. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References

- (1) Tiniakos, D. G.; Vos, M. B.; Brunt, E. M. Nonalcoholic fatty liver disease: Pathology and pathogenesis. *Annu. Rev. Pathol.: Mech. Dis.* **2010**, *50*, 145–171.
- (2) Fabbrini, E.; Sullivan, S.; Klein, S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology* **2010**, *51*, 679–689.
- (3) Malaguerna, M.; Di Rosa, M.; Nicoletti, F.; Malaguerna, L. Molecular mechanisms involved in NAFLD progression. *J. Mol. Med.* **2009**, *87*, 679–695.
- (4) Neuschwander-Tetri, B.; Caldwell, S. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD single topic conference. *Hepatology* **2003**, *37*, 1202–1219.
- (5) Johnson, N. A.; Walton, D. W.; Sachinwalla, T.; Thompson, C. H.; Smith, K.; Ruell, P. A.; Stannard, S. R.; George, J. Noninvasive assessment of hepatic lipid composition: Advancing understanding and management of fatty liver disorders. *Hepatology* **2008**, *47* (5), 1513–1523.
- (6) Brunt, E. M. Nonalcoholic steatohepatitis. *Semin. Liver Dis.* **2004**, *24* (1), 3–20.
- (7) Day, C. P.; James, O. F. W. Steatohepatitis: A tale of two “hits”. *Gastroenterology* **1998**, *114* (4), 842–845.
- (8) Browning, J. D.; Horton, J. D. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J. Clin. Invest.* **2004**, *114* (2), 147–152.
- (9) Mari, M.; Caballero, F.; Colell, A.; Morales, A.; Caballeria, J.; Fernandez, A.; Enrich, C.; Fernandez-Chorca, J. C.; Garcia-Ruiz, C. Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- α and Fas-mediated steatohepatitis. *Cell Metab.* **2006**, *4* (3), 185–198.
- (10) Rull, A.; Escolà-Gil, J. C.; Julve, J.; Rotllan, N.; Calpe-Berdiel, L.; Coll, B.; Aragonès, G.; Marsillach, J.; Alonso-Villaverde, C.; Camps, J.; Blanco-Vaca, F.; Joven, J. Deficiency in monocyte chemoattractant protein-1 modifies lipid and glucose metabolism. *Exp. Mol. Pathol.* **2007**, *83* (3), 361–366.
- (11) Joven, J.; Rull, A.; Ferré, N.; Escolà-Gil, J. C.; Marsillach, J.; Coll, B.; Alonso-Villaverde, C.; Aragonès, G.; Claria, J.; Camps, J. The results in rodent models of atherosclerosis are not interchangeable: The influence of diet and strain. *Atherosclerosis* **2007**, *195* (2), e85–e92.
- (12) Wouters, K.; Gorp, P. J. v.; Bieghs, V.; Gijbels, M. J.; Duimel, H.; Lütjohann, D.; Kerksiek, A.; Kruchten, R. v.; Maeda, N.; Staels, B.; Bilsen, M. v.; Shiri-Sverdlov, R.; Hofker, M. H. Dietary cholesterol, rather than liver steatosis, leads to hepatic inflammation in hyperlipidemic mouse models of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* **2008**, *48* (2), 474–486.
- (13) Rull, A.; Vinaixa, M.; Angel Rodríguez, M.; Beltrán, R.; Brezmes, J.; Cañellas, N.; Correig, X.; Joven, J. Metabolic phenotyping of genetically modified mice: An NMR metabolomic approach. *Biochimie* **2009**, *91* (8), 1053–1057.
- (14) Wishart, D. S. Quantitative metabolomics using NMR. *Trends Anal. Chem.* **2008**, *27* (3), 228–237.
- (15) Xu, E. Y.; Schaefer, W. H.; Xu, Q. Metabolomics in pharmaceutical research and development: metabolites, mechanisms and pathways. *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* **2009**, *12* (1), 40–52.
- (16) Ekman, D.; Keun, H.; Eads, C.; Furnish, C.; Murrell, R.; Rockett, J.; Dix, D. Metabolomic evaluation of rat liver and testis to characterize the toxicity of triazole fungicides. *Metabolomics* **2006**, *2* (2), 63–73.
- (17) Waters, N. J.; Holmes, E.; Williams, A.; Waterfield, C. J.; Farrant, R. D.; Nicholson, J. K. NMR and Pattern Recognition Studies on the Time-Related Metabolic Effects of α -Naphthylisothiocyanate on Liver, Urine, and Plasma in the Rat: An Integrative Metabolomic Approach. *Chem. Res. Toxicol.* **2001**, *14* (10), 1401–1412.
- (18) Atherton, H. J.; Bailey, N. J.; Zhang, W.; Taylor, J.; Major, H.; Shockcor, J.; Clarke, K.; Griffin, J. L. A combined H-1-NMR spectroscopy- and mass spectrometry-based metabolomic study of the PPAR-alpha null mutant mouse defines profound systemic changes in metabolism linked to the metabolic syndrome. *Physiol. Genomics* **2006**, *27* (2), 178–186.
- (19) Serkova, N. J.; Zhang, Y.; Coatney, J. L.; Hunter, L.; Wachs, M. E.; Niemann, C. U.; Mandell, M. S. Early detection of graft failure using the blood metabolic profile of a liver recipient. *Transplantation* **2007**, *83* (4), 517–521.
- (20) Griffiths, W. J. *Metabolomics, Metabonomics and Metabolite Profiling*; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, U.K., 2008.
- (21) Rull, A.; Rodríguez, F.; Aragonès, G.; Marsillach, J.; Beltrán, R.; Alonso-Villaverde, C.; Camps, J.; Joven, J. Hepatic monocyte chemoattractant protein-1 is upregulated by dietary cholesterol and contributes to liver steatosis. *Cytokine* **2009**, *48* (3), 273–279.
- (22) Tous, M.; Ferré, N.; Camps, J.; Riu, F.; Joven, J. Feeding apolipoprotein E-knockout mice with cholesterol and fat enriched diets may be a model of non-alcoholic steatohepatitis. *Mol. Cell. Biochem.* **2005**, *268* (1–2), 53–58.
- (23) Tous, M.; Ferré, N.; Rull, A.; Marsillach, J.; Coll, B.; Alonso-Villaverde, C.; Camps, J.; Joven, J. Dietary cholesterol and differential monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in aorta and liver of apo E-deficient mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *340* (4), 1078–1084.
- (24) Calleja, L.; Paris, M. A.; Paul, A.; Vilella, E.; Joven, J.; Jimenez, A.; Beltran, G.; Uceda, M.; Maeda, N.; Osada, J. Low-cholesterol and high-fat diets reduce atherosclerotic lesion development in ApoE-knockout mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **1999**, *19* (10), 2368–2375.
- (25) Shi, C.; Wu, C. Q.; Cao, A. M.; Sheng, H. Z.; Yan, X. Z.; Liao, M. Y. NMR-spectroscopy-based metabolomic approach to the analysis of Bay41–4109, a novel anti-HBV compound, induced hepatotoxicity in rats. *Toxicol. Lett.* **2007**, *173* (3), 161–167.
- (26) Coen, M.; Lenz, E. M.; Nicholson, J. K.; Wilson, I. D.; Pognan, F.; Lindon, J. C. An integrated metabolomic investigation of acetaminophen toxicity in the mouse using NMR spectroscopy. *Chem. Res. Toxicol.* **2003**, *16* (3), 295–303.
- (27) Casu, M.; Anderson, G. J.; Choi, G.; Gibbons, W. A. NMR Lipid Profiles of Cells, Tissues and Body Fluids (1D and 2D Proton NMR of Lipids from Rat Liver). *Magn. Reson. Chem.* **1991**, *29*, 594–602.
- (28) Sparling, M. L. Analysis of Mixed Lipid Extracts Using H-1-Nmr Spectra. *Comput. Appl. Biosci.* **1990**, *6* (1), 29–42.
- (29) Sparling, M. L.; Zidovetzki, R.; Muller, L.; Chan, S. I. Analysis of Membrane-Lipids by 500 MHz H-1-Nmr. *Anal. Biochem.* **1989**, *178* (1), 67–76.
- (30) Adosraku, R. K.; Choi, G. T.; Constantinou-Kokotos, V.; Anderson, M. M.; Gibbons, W. A. NMR lipid profiles of cells, tissues, and body fluids: proton NMR analysis of human erythrocyte lipids. *J. Lipid Res.* **1994**, *35* (11), 1925–1931.
- (31) Serkova, N. J.; Jackman, M.; Brown, J. L.; Liu, T.; Hirose, R.; Roberts, J. P.; Maher, J. J.; Niemann, C. U. Metabolic profiling of livers and blood from obese Zucker rats. *J. Hepatol.* **2006**, *44* (5), 956–962.
- (32) Pollesello, P.; Masutti, F.; Croce, L. S.; Toffanin, R.; Eriksson, O.; Paoletti, S.; Hockersstedt, K.; Tiribelli, C. 1H-NMR Spectroscopic Studies of Lipid Extracts from Human Fatty Liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, *192* (3), 1217–1222.
- (33) Claus, S. P.; Tsang, T. M.; Wang, Y.; Cloarec, O.; Skordi, E.; Martin, F.-P.; Rezzli, S.; Ross, A.; Kochhar, S.; Holmes, E.; Nicholson, J. K. Systemic multicompartmental effects of the gut microbiome on mouse metabolic phenotypes. *Mol. Syst. Biol.* **2008**, *4*.
- (34) Papanasiou, A.; Kostara, C.; Cung, M. T.; Seferiadis, K.; Elisaf, M.; Bairaktari, E.; Goudevenos, I. A. Analysis of the composition of plasma lipoproteins in patients with extensive coronary heart disease using H-1 NMR spectroscopy. *Hellenic J. Cardiol.* **2008**, *49* (2), 72–78.
- (35) Cloarec, O.; Dumas, M.-E.; Craig, A.; Barton, R. H.; Trygg, J.; Hudson, J.; Blancher, C.; Gauguier, D.; Lindon, J. C.; Holmes, E.; Nicholson, J. K. Statistical Total Correlation Spectroscopy: An Exploratory Approach for Latent Biomarker Identification from Metabolic 1H NMR Data Sets. *Anal. Chem.* **2005**, *77* (5), 1282–1289.
- (36) Serkova, N.; Fuller, T. F.; Klawitter, J.; Freise, C. E.; Niemann, C. U. H-1-NMR-based metabolic signatures of mild and severe ischemia/reperfusion injury in rat kidney transplants. *Kidney Int.* **2005**, *67* (3), 1142–1151.
- (37) Galli, F.; Varga, Z.; Balla, J.; Ferraro, B.; Canestrari, F.; Floridi, A.; Vitamin, E. Lipid profile, and peroxidation in hemodialysis patients. *Kidney Int. Suppl.* **2001**, *78*, S148–S154.
- (38) Araya, J.; Rodrigo, R.; Videla, L. A.; Thieleman, L. D.; Orellana, M.; Pettinelli, P.; Poniachik, J. Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n-6/n-3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Clin. Sci.* **2004**, *106* (6), 635–643.
- (39) Elizondo, A.; Araya, J.; Rodrigo, R.; Poniachik, J.; Csendes, A.; Maluenda, F.; Diaz, J. C.; Signorini, C.; Sgherri, C.; Comporti, M.; Videla, L. A. Polyunsaturated fatty acid pattern in liver and erythrocyte phospholipids from obese patients. *Obesity* **2007**, *15* (1), 24–31.
- (40) Puri, P.; Baillie, R. A.; Wiest, M. M.; Mirshahi, F.; Choudhury, J.; Cheung, O.; Sargeant, C.; Contos, M. J.; Sanyal, A. J. A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **2007**, *46* (4), 1081–1090.
- (41) Videla, L. A.; Rodrigo, R.; Araya, J.; Poniachik, J. Oxidative stress and depletion of hepatic long-chain polyunsaturated fatty acids

- may contribute to nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radical Biol. Med.* **2004**, *37* (9), 1499–1507.
- (42) Sears, D. D.; Miles, P. D.; Chapman, J.; Ofrecio, J. M.; Almazan, F.; Thapar, D.; Miller, Y. I. 12/15-Lipoxygenase Is Required for the Early Onset of High Fat Diet-Induced Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance in Mice. *PLoS ONE* **2009**, *4* (9), e7250.
- (43) Zhao, L.; Funk, C. D. Lipoxygenase Pathways in Atherogenesis. *Trends Cardiovasc. Med.* **2004**, *14* (5), 191–195.
- (44) McClain, C. J.; Hill, D. B.; Song, Z.; Chawla, R.; Watson, W. H.; Chen, T.; Barve, S. S-Adenosylmethionine, cytokines, and alcoholic liver disease. *Alcohol* **2002**, *27* (3), 185–192.
- (45) Wortham, M.; He, L.; Gyamfi, M.; Copple, B.; Wan, Y.-J. The Transition from Fatty Liver to NASH Associates with SAMe Depletion in db/db Mice Fed a Methionine Choline-Deficient Diet. *Dig. Dis. Sci.* **2008**, *53* (10), 2761–2774.
- (46) Santamaría, E.; Avila, M. A.; Latasa, M. U.; Rubio, A.; Martín-Duce, A.; Lu, S. C.; Mato, J. M.; Corrales, F. J. Functional proteomics of nonalcoholic steatohepatitis: Mitochondrial proteins as targets of S-adenosylmethionine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100* (6), 3065–3070.
- (47) Wu, G.; Fang, Y.-Z.; Yang, S.; Lupton, J. R.; Turner, N. D. Glutathione metabolism and its implication for health. *J. Nutrition* **2004**, *134*, 489–492.
- (48) Yuan, L.; Kaplowitz, N. Glutathione in liver diseases and hepatotoxicity. *Mol. Aspects Med.* , *30* (1–2), 29–41.
- (49) Jennifer, E. M.; Rodman, D. S.; John, E; V, K. Gamma-Glutamyl Transferase: A Novel Cardiovascular Risk BioMarker. *Prev. Cardiol.* , *13* (1), 36–41.
- (50) Noland, R. C.; Koves, T. R.; Seiler, S. E.; Lum, H.; Lust, R. M.; Ilkayeva, O.; Stevens, R. D.; Hegardt, F. G.; Muoio, D. M. Carnitine Insufficiency Caused by Aging and Overnutrition Compromises Mitochondrial Performance and Metabolic Control. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284* (34), 22840–22852.

PR901203W

SUPPORTING INFORMATION

Metabolomic assessment of the effect of dietary cholesterol in the progressive development of fatty liver disease

Maria Vinaixa^{1*}, Miguel Ángel Rodríguez¹, Anna Rull², Raúl Beltrán², Cinta Bladé¹, Jesús Brezmes¹, Nicolau Cañellas¹, Jorge Joven², Xavier Correig¹

¹Metabolomics Platform, CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Avda. Països Catalans 26, 43007 Tarragona, Spain.

²Centre de Recerca Biomèdica, Hospital Universitari Sant Joan de Reus, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, c/ Sant Joan s/n, 43201 Reus, Spain

*Maria Vinaixa Crevillent

Metabolomics Platform,

CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM)-Universitat Rovira i Virgili

Avda. Països Catalans 26, 43007 Tarragona, Spain

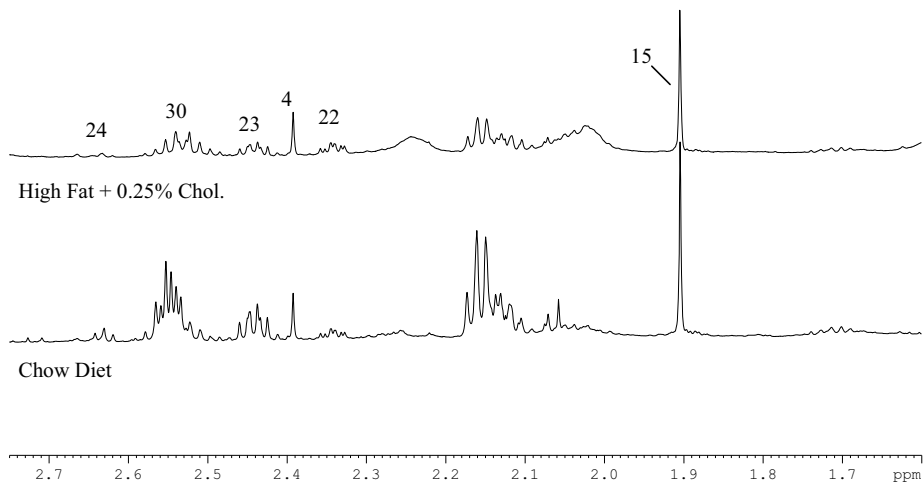
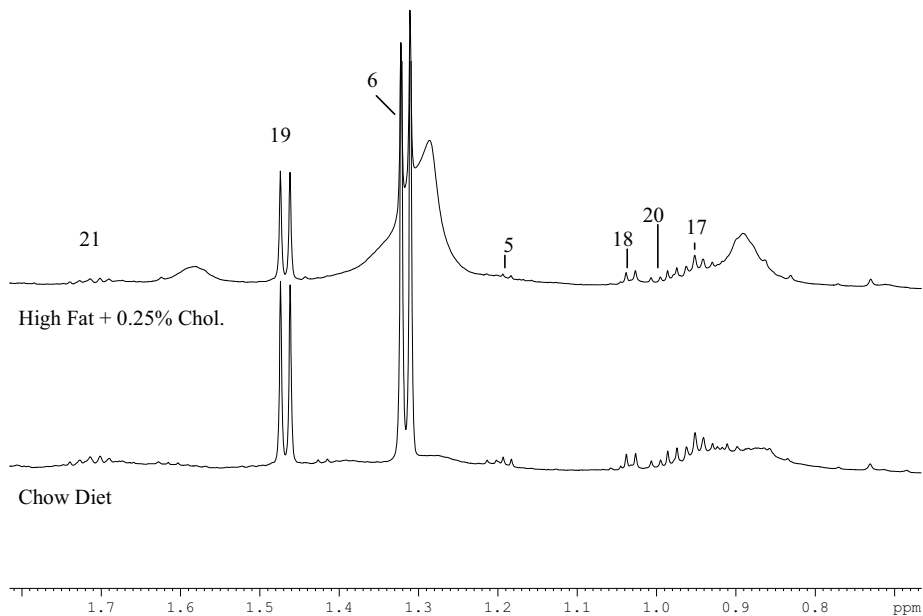
E-mail address: maria.vinaixa@urv.cat

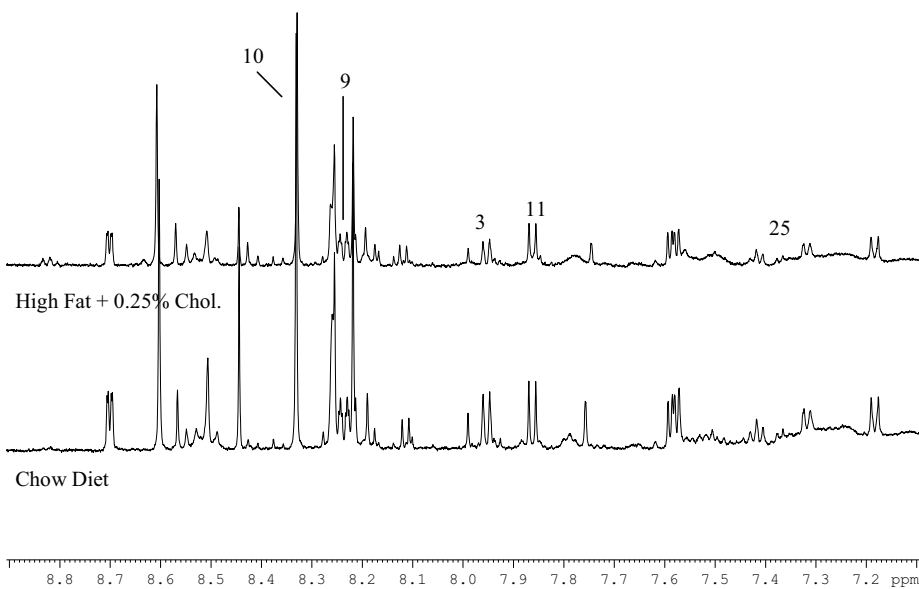
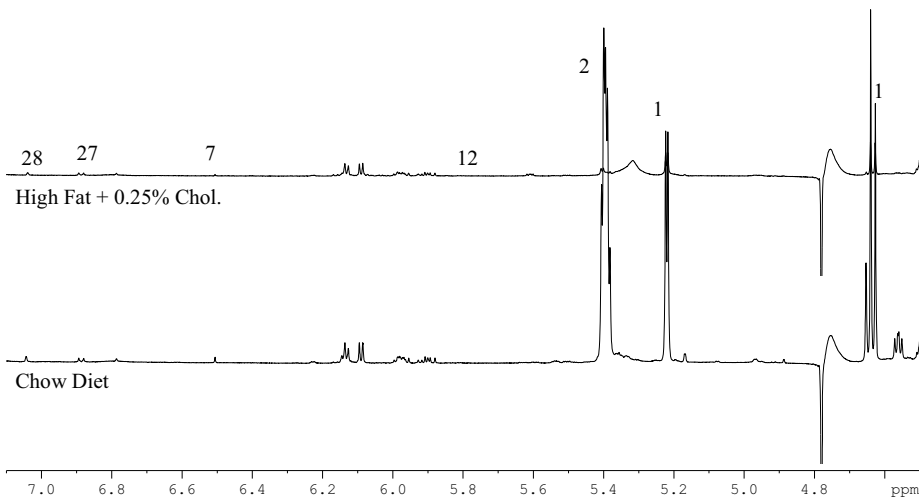
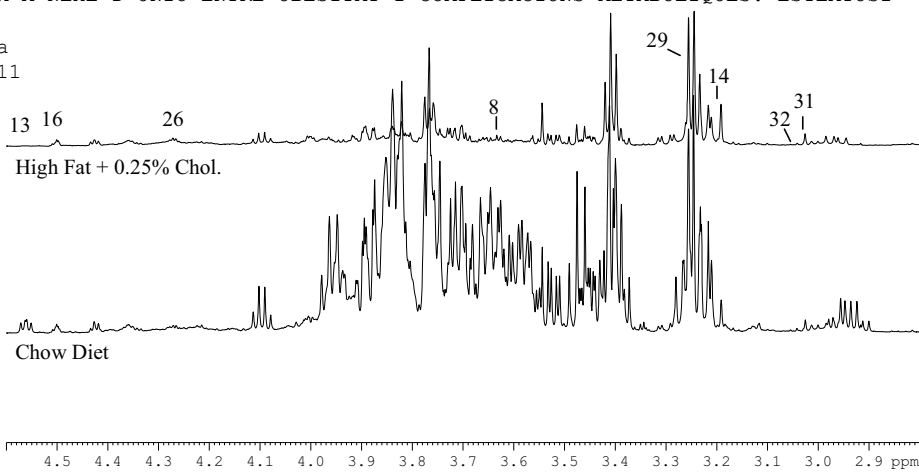
Tf. +34-977256587

Fax: +34-977559605

www.metabolomicsplatform.com

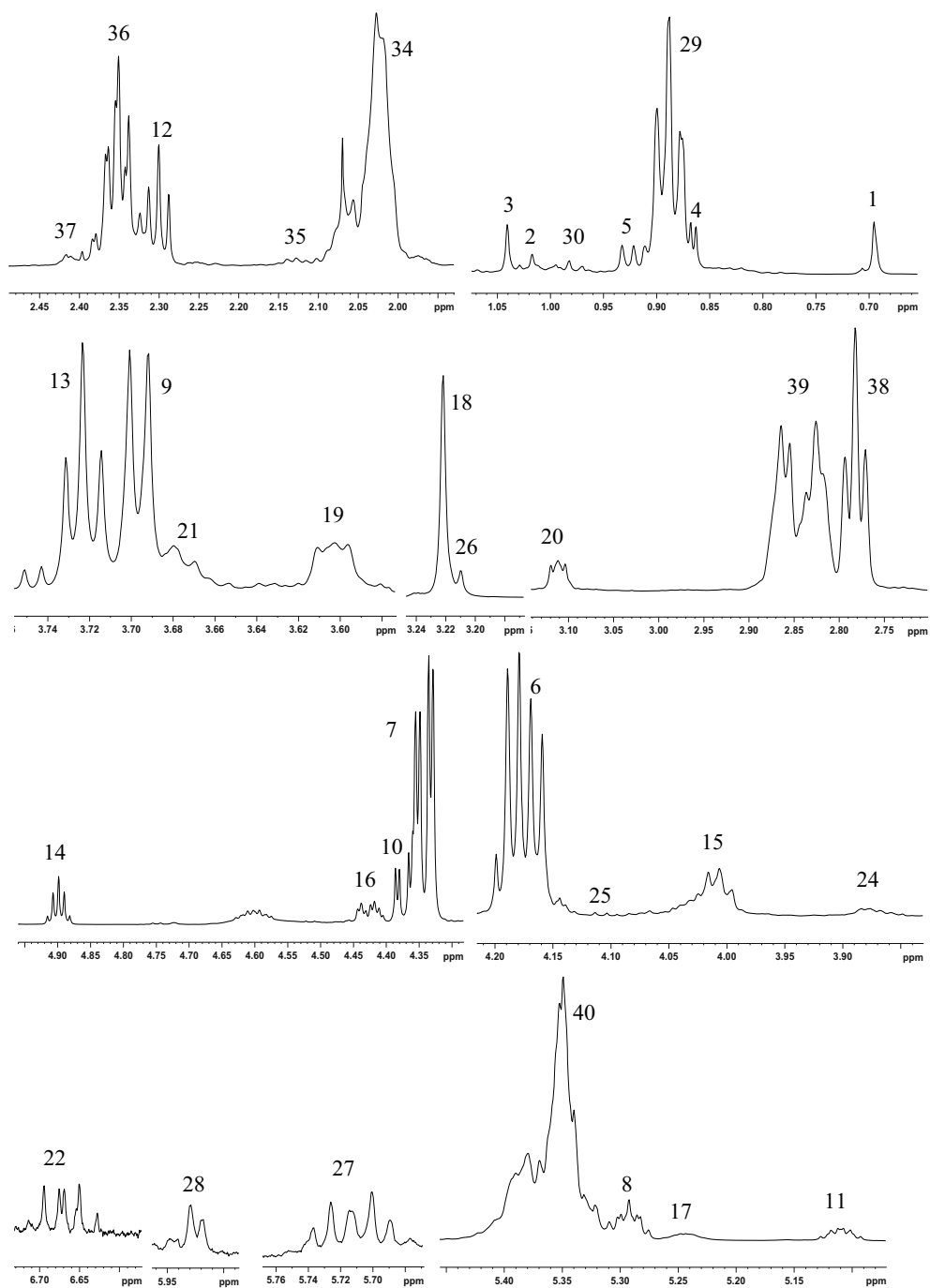
Supplementary Figure S1: ^1H NMR spectra (600 MHz) of liver aqueous extracts of Chow and High Fat + 0.25% Chol. diets at 16 weeks of age. For identification of the peak numbers, refer to codes in Table 1.





Supplementary Figure S2: ^1H NMR spectra (600 MHz) of liver lipidic extract. For

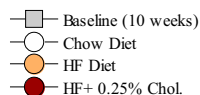
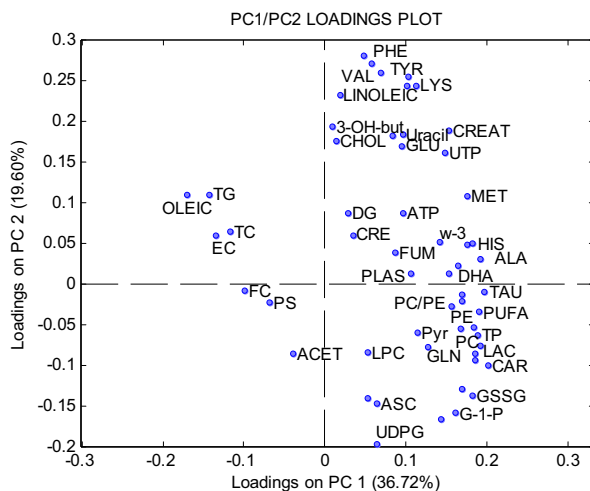
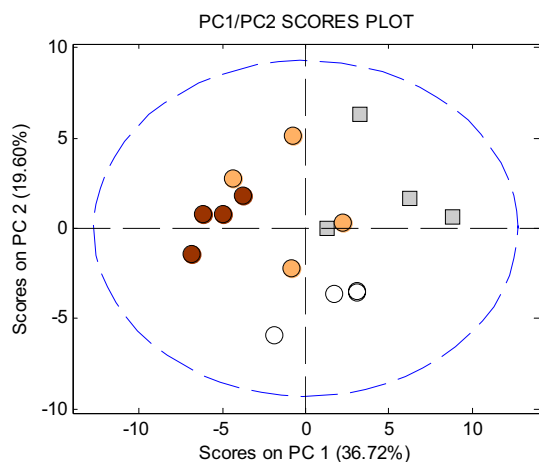
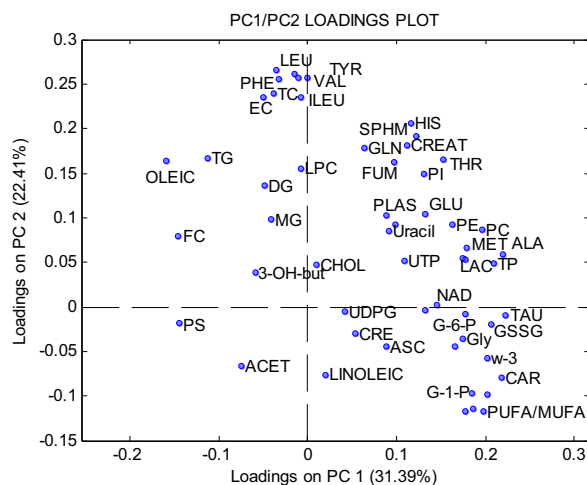
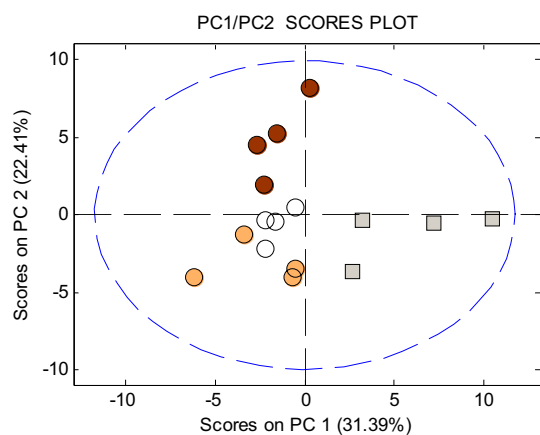
identification of the peak numbers, refer to codes in Table 1.



Supplementary Figure S3: Results of the two PCA models fit either at 16-weeks time

point (A) and 32-weeks time point (B) using data derived from concentrations of

metabolites identified in both lipophilic and hydrophilic liver extracts.

**A) PCA ANALYSIS 16 WEEKS OF AGE****B) PCA ANALYSIS 32 WEEKS OF AGE**

Total Cholesterol: TC; Free Cholesterol: FC; Esterified Cholesterol: EC; Triglycerides : TG; Diglycerides: DG; Monoglycerides : MG; Total Phospholipids : TP; Phosphatidylethanolamine: PE; Phosphatidylcholine: PC; Phosphatidylinositol : PI; Phosphatidylserine : PS; Lysophosphatidylcholine : LPC; Sphingomyelin : SPHM; Plasmalogen : PLAS; omega-3 : w-3; Arachidonic acid + Eicosapentaenoic acid : ARA+EPA; Oleic acid : OLEIC; Docohexanoic Acid: DHA; Linoleic acid: LINOLEIC; Polyunsaturated Fatty Acyls: PUFA; Monounsaturated Fatty Acyls: MUFA; PUFA/MUFA ratio: PUFA/MUFA; Phosphatidylcholine/Phosphatidylethanolamine ratio: PC/PE; Glucose-6-Phosphate: G-6-P; Glucose-1-Phosphate (Glycogen): G-1-P; UDPG: UDPG; Pyruvate: Pyr; 3-hydroxybutyrate: 3-OH-but; Lactate: LAC; Fumarate: FUM; Free Glycerol: Free Gly; NADH/NADP/NADPH: NADH/NADP/NADPH; ATP/ADP/AMP: ATP/ADP/AMP; UTP/UDP/UMP: UTP/UDP/UMP; Uracil: Uracil; Carnitine: CAR; Cholines: CHOL; Acetates: ACET; Ascorbic acid: ASC; Leucine: LEU; Valine: VAL; Alanine: ALA; Isoleucine: ILEU; Lysine: LYS; Glutamine: GLN; Glutamate: GLU; Methionine: MET; Phenylalanine: PHE; Threonine: THR; Tyrosine: TYR; Histidine: HIS; Taurine: TAU; Glutathione (oxidized): GSSG; Creatine: CRE; Creatinine: CREAT.

Supporting Table S1: Absolute individual concentrations of metabolites identified in both aqueous and lipophilic extracts. Data comparison between high-fat and high-fat high-cholesterol diets with respect to chow diet used the Mann-Whitney U test ($p < 0.05$). Data is expressed as mean \pm SEM.

Lipid-soluble ($\mu\text{mol/g liver}$)	10 weeks age			16 weeks age			32 weeks age		
	Chow Diet	Chow Diet	Chow Diet	HF Diet	HF Diet	HF Diet	Chow Diet	HF Diet	HF Diet
	HF+0.25 Chol			HF+0.25 Chol			HF+0.25 Chol		
Total Cholesterol	17.80 \pm 3.11	14.09 \pm 1.56	17.44 \pm 1.60	74.40 \pm 15.96*	17.02 \pm 0.65	14.15 \pm 2.24	120.18 \pm 8.13*	14.15 \pm 2.24	120.18 \pm 8.13*
Free Cholesterol	1.72 \pm 0.22	5.42 \pm 0.71	5.45 \pm 0.70	6.58 \pm 1.30	9.05 \pm 1.14	9.05 \pm 1.24	10.17 \pm 1.59	9.05 \pm 1.24	10.17 \pm 1.59
Esterified Cholesterol	4.58 \pm 0.98	3.90 \pm 0.51	7.52 \pm 1.51	61.03 \pm 13.46*	7.66 \pm 0.70	5.88 \pm 0.99	91.78 \pm 9.19*	5.88 \pm 0.99	91.78 \pm 9.19*
Triglycerides	13.60 \pm 1.37	20.14 \pm 3.71	78.15 \pm 28.14*	133.02 \pm 38.23*	116.42 \pm 23.89	128.41 \pm 19.09	332.46 \pm 75.74*	128.41 \pm 19.09	332.46 \pm 75.74*
Diglycerides	5.42 \pm 0.56	5.09 \pm 0.71	5.71 \pm 0.92	5.39 \pm 0.93	8.84 \pm 0.67	4.88 \pm 0.48*	26.21 \pm 14.11*	4.88 \pm 0.48*	26.21 \pm 14.11*
Monoglycerides	0.35 \pm 0.11	0.68 \pm 0.22	0.43 \pm 0.04	0.37 \pm 0.09	0.44 \pm 0.10	0.35 \pm 0.06	9.25 \pm 8.86	0.35 \pm 0.06	9.25 \pm 8.86
Total Phospholipids	50.05 \pm 7.20	48.36 \pm 5.33	39.24 \pm 4.99	28.34 \pm 4.78	36.94 \pm 2.20	31.54 \pm 6.14	38.51 \pm 2.49	31.54 \pm 6.14	38.51 \pm 2.49
Phosphatidylethanolamine	19.54 \pm 2.73	19.25 \pm 1.96	17.45 \pm 1.68	13.56 \pm 2.13	17.49 \pm 0.85	14.38 \pm 2.67	18.46 \pm 1.04	14.38 \pm 2.67	18.46 \pm 1.04
Phosphatidylcholine	37.62 \pm 5.69	36.17 \pm 4.55	29.17 \pm 4.13	21.44 \pm 4.11	26.67 \pm 1.73	24.58 \pm 4.43	32.43 \pm 1.85	24.58 \pm 4.43	32.43 \pm 1.85
Phosphatidylinositol	4.65 \pm 0.77	3.83 \pm 0.39	3.92 \pm 0.49	2.91 \pm 0.54	3.18 \pm 0.30	3.37 \pm 0.55	5.06 \pm 0.63	3.37 \pm 0.55	5.06 \pm 0.63
Phosphatidylserine	0.16 \pm 0.03	0.85 \pm 0.11	0.92 \pm 0.15	0.69 \pm 0.12	1.66 \pm 0.17	1.56 \pm 0.23	1.10 \pm 0.25	1.56 \pm 0.23	1.10 \pm 0.25
Lysophosphatidylcholine	0.81 \pm 0.12	2.01 \pm 1.26	0.76 \pm 0.06	0.79 \pm 0.07	1.32 \pm 0.46	0.80 \pm 0.19	1.41 \pm 0.22	0.80 \pm 0.19	1.41 \pm 0.22
Sphingomyelin	2.11 \pm 0.34	1.97 \pm 0.28	1.68 \pm 0.30	1.49 \pm 0.31	1.68 \pm 0.13	1.48 \pm 0.29	2.53 \pm 0.20*	1.68 \pm 0.13	2.53 \pm 0.20*
Plasmalogen	1.13 \pm 0.22	0.75 \pm 0.09	0.65 \pm 0.08	0.65 \pm 0.12	0.86 \pm 0.06	0.64 \pm 0.12	1.11 \pm 0.04*	0.86 \pm 0.06	1.11 \pm 0.04*
PUFA/MUFA	0.38 \pm 0.01	0.34 \pm 0.02	0.26 \pm 0.04	0.15 \pm 0.01*	0.45 \pm 0.06	0.30 \pm 0.05	0.21 \pm 0.01*	0.45 \pm 0.06	0.21 \pm 0.01*
PC/PE	1.93 \pm 0.08	1.87 \pm 0.09	1.65 \pm 0.07	1.56 \pm 0.05	1.52 \pm 0.04	1.73 \pm 0.06	1.74 \pm 0.06	1.73 \pm 0.06	1.74 \pm 0.06
Lipid-soluble (% mol)									
ω -3	7.83 \pm 0.20	5.92 \pm 0.35	5.87 \pm 0.46	5.77 \pm 0.19	4.99 \pm 0.59	3.83 \pm 0.58	3.99 \pm 0.37	3.83 \pm 0.58	3.99 \pm 0.37
ARA+EPA	14.37 \pm 0.36	17.72 \pm 1.37	9.78 \pm 1.97*	6.09 \pm 0.98*	9.16 \pm 2.07	7.06 \pm 1.39	3.24 \pm 0.37*	7.06 \pm 1.39	3.24 \pm 0.37*
Oleic	24.84 \pm 0.34	25.26 \pm 1.87	32.48 \pm 2.69	40.41 \pm 0.89*	32.34 \pm 2.38	36.87 \pm 1.52	46.90 \pm 0.33*	36.87 \pm 1.52	46.90 \pm 0.33*
DHA	5.47 \pm 0.40	3.78 \pm 0.25	4.10 \pm 0.36	2.25 \pm 0.12*	2.86 \pm 0.47	2.40 \pm 0.45	1.64 \pm 0.11*	2.40 \pm 0.45	1.64 \pm 0.11*
Linoleic	18.55 \pm 1.00	16.96 \pm 0.82	19.23 \pm 1.26	17.11 \pm 0.47	25.87 \pm 1.74	14.94 \pm 0.71*	13.41 \pm 0.65*	14.94 \pm 0.71*	13.41 \pm 0.65*
PUFA	64.32 \pm 1.40	49.80 \pm 3.84	39.23 \pm 5.50	22.91 \pm 1.44*	32.53 \pm 4.31	22.84 \pm 3.96	16.21 \pm 1.10*	22.84 \pm 3.96	16.21 \pm 1.10*
MUFA	84.78 \pm 0.77	72.73 \pm 3.38	75.43 \pm 2.36	76.79 \pm 0.72	72.73 \pm 3.38	75.43 \pm 2.36*	76.79 \pm 0.72	75.43 \pm 2.36*	76.79 \pm 0.72
Water-soluble ($\mu\text{mol/g liver}$)									
Glucose-6-Phosphate	19.34 \pm 2.79	18.45 \pm 3.44	8.87 \pm 3.85	3.10 \pm 0.47*	2.67 \pm 0.98	12.29 \pm 1.42*	9.18 \pm 3.24	12.29 \pm 1.42*	9.18 \pm 3.24
Glucose-1-Phosphate (Glycogen)	40.63 \pm 10.31	50.56 \pm 10.27	19.70 \pm 11.49	2.39 \pm 0.56*	0.57 \pm 0.14	25.82 \pm 3.72*	4.41 \pm 1.65	25.82 \pm 3.72*	4.41 \pm 1.65
UDPG	0.17 \pm 0.05	0.41 \pm 0.05	0.21 \pm 0.05*	0.22 \pm 0.04	0.20 \pm 0.10	0.16 \pm 0.08	0.22 \pm 0.02	0.16 \pm 0.08	0.22 \pm 0.02
Pyruvate	0.53 \pm 0.29	0.56 \pm 0.08	0.31 \pm 0.06*	0.42 \pm 0.13	0.25 \pm 0.08	0.38 \pm 0.17	0.21 \pm 0.05	0.38 \pm 0.17	0.21 \pm 0.05
3-hydroxybutyrate	0.21 \pm 0.02	0.18 \pm 0.03	0.24 \pm 0.03	0.23 \pm 0.04	0.39 \pm 0.12	0.24 \pm 0.05	0.30 \pm 0.04	0.24 \pm 0.05	0.30 \pm 0.04

Water-soluble (µmol/ g liver)	10 weeks age			16 weeks age			32 weeks age		
	Chow Diet		HF Diet	Chow Diet		HF Diet	Chow Diet		HF Diet
	Chow Diet	HF Diet	HF Diet	Chow Diet	HF Diet	HF Diet	Chow Diet	HF Diet	
Lactate	7.26 ± 0.63	6.98 ± 1.06	3.86 ± 0.90	3.00 ± 0.09*	3.51 ± 0.64	4.42 ± 0.89	3.51 ± 0.64	4.42 ± 0.89	5.54 ± 1.20
Fumarate	0.14 ± 0.03	0.09 ± 0.02	0.09 ± 0.01	0.10 ± 0.02	0.11 ± 0.01	0.06 ± 0.00*	0.11 ± 0.01	0.06 ± 0.00*	0.14 ± 0.02
Free Glycerol	13.25 ± 2.60	14.27 ± 3.01	6.61 ± 3.12	1.53 ± 0.25*	2.36 ± 0.29	7.99 ± 0.84*	2.36 ± 0.29	7.99 ± 0.84*	5.49 ± 2.40
NADH/NADP/NADPH	0.45 ± 0.08	0.44 ± 0.06	0.44 ± 0.05	0.32 ± 0.06	0.42 ± 0.04	0.33 ± 0.07	0.42 ± 0.04	0.33 ± 0.07	0.39 ± 0.03
ATP/ADP/AMP	1.22 ± 0.18	1.15 ± 0.17	1.48 ± 0.16	1.04 ± 0.15	1.28 ± 0.15	1.03 ± 0.15	1.28 ± 0.15	1.03 ± 0.15	1.28 ± 0.12
UTP/UDP/UMP	0.50 ± 0.07	0.34 ± 0.05	0.42 ± 0.04	0.32 ± 0.05	0.51 ± 0.05	0.40 ± 0.07	0.51 ± 0.05	0.40 ± 0.07	0.40 ± 0.06
Uracil	0.13 ± 0.04	0.07 ± 0.01	0.12 ± 0.02	0.05 ± 0.01	0.08 ± 0.03	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.03	0.07 ± 0.01	0.09 ± 0.03
Carnitine	2.37 ± 0.55	2.38 ± 0.32	0.90 ± 0.44	0.32 ± 0.12*	0.51 ± 0.05	1.06 ± 0.34	0.51 ± 0.05	1.06 ± 0.34	0.43 ± 0.02
Cholines	0.31 ± 0.04	0.24 ± 0.04	0.43 ± 0.06	0.32 ± 0.08	0.46 ± 0.09	0.27 ± 0.04	0.46 ± 0.09	0.27 ± 0.04	0.34 ± 0.04
Acetates	1.27 ± 0.10	1.88 ± 0.39	1.77 ± 0.39	1.77 ± 0.34	1.92 ± 0.29	1.79 ± 0.19	1.92 ± 0.29	1.79 ± 0.19	1.47 ± 0.07
Ascorbic acid	1.42 ± 0.33	2.54 ± 0.36	1.54 ± 0.21*	1.56 ± 0.38	1.49 ± 0.54	1.17 ± 0.38	1.49 ± 0.54	1.17 ± 0.38	1.15 ± 0.13
Leucine	0.59 ± 0.08	0.36 ± 0.05	0.56 ± 0.05	0.48 ± 0.03	0.70 ± 0.06	0.50 ± 0.06	0.70 ± 0.06	0.50 ± 0.06	1.04 ± 0.15
Valine	0.52 ± 0.06	0.35 ± 0.03	0.45 ± 0.05	0.43 ± 0.03	0.59 ± 0.07	0.41 ± 0.04	0.59 ± 0.07	0.41 ± 0.04	0.89 ± 0.15
Alanine	4.99 ± 0.89	3.38 ± 0.29	3.19 ± 0.69	2.44 ± 0.31	3.15 ± 0.20	2.98 ± 0.47	3.15 ± 0.20	2.98 ± 0.47	3.70 ± 0.26
Isoleucine	0.25 ± 0.03	0.16 ± 0.02	0.23 ± 0.02	0.16 ± 0.01	0.29 ± 0.03	0.20 ± 0.02	0.29 ± 0.03	0.20 ± 0.02	0.34 ± 0.06
Lysine	0.89 ± 0.08	0.59 ± 0.04	0.76 ± 0.09	0.61 ± 0.04	1.01 ± 0.11	0.67 ± 0.08	1.01 ± 0.11	0.67 ± 0.08	1.26 ± 0.14
Glutamine	1.64 ± 0.14	2.16 ± 0.35	1.62 ± 0.33	1.30 ± 0.18	1.37 ± 0.25	1.30 ± 0.24	1.37 ± 0.25	1.30 ± 0.24	2.11 ± 0.24
Glutamate	1.56 ± 0.40	0.75 ± 0.05	0.74 ± 0.09	0.98 ± 0.23	0.93 ± 0.05	0.68 ± 0.09	0.93 ± 0.05	0.68 ± 0.09	1.27 ± 0.04*
Methionine	0.93 ± 0.14	0.41 ± 0.08	0.45 ± 0.05	0.33 ± 0.05	0.75 ± 0.12	0.30 ± 0.03*	0.75 ± 0.12	0.30 ± 0.03*	0.57 ± 0.05
Phenylalanine	0.23 ± 0.03	0.11 ± 0.02	0.21 ± 0.02*	0.15 ± 0.02	0.27 ± 0.04	0.19 ± 0.03	0.27 ± 0.04	0.19 ± 0.03	0.39 ± 0.06
Threonine	0.76 ± 0.10	0.69 ± 0.10	0.70 ± 0.07	0.52 ± 0.07	0.69 ± 0.01	0.56 ± 0.06	0.69 ± 0.01	0.56 ± 0.06	0.78 ± 0.06
Tyrosine	0.23 ± 0.03	0.12 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.14 ± 0.02	0.24 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.24 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.32 ± 0.04
Histidine	0.24 ± 0.03	0.22 ± 0.03	0.18 ± 0.03	0.14 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.14 ± 0.01	0.18 ± 0.02	0.14 ± 0.01	0.26 ± 0.04
Taurine	27.46 ± 3.17	24.98 ± 2.66	19.38 ± 2.48	13.46 ± 2.35*	14.54 ± 2.30	12.32 ± 2.15	14.54 ± 2.30	12.32 ± 2.15	15.00 ± 1.65
Glutathione (oxidized)	2.39 ± 0.42	3.03 ± 0.29	1.87 ± 0.43	1.20 ± 0.20*	1.24 ± 0.14	1.56 ± 0.39	1.24 ± 0.14	1.56 ± 0.39	1.56 ± 0.08
Creatine	0.87 ± 0.42	0.25 ± 0.03	0.31 ± 0.05	0.28 ± 0.04	0.39 ± 0.03	0.26 ± 0.03	0.39 ± 0.03	0.26 ± 0.03	0.46 ± 0.04
Creatinine	0.14 ± 0.02	0.05 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.11 ± 0.02	0.08 ± 0.01	0.11 ± 0.02	0.08 ± 0.01	0.14 ± 0.02

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLAMACIÓ COM A NEXE D'UNIÓ ENTRE OBESITAT I COMPLICACIONS METABÒLIQUES: ESTEATOSI
HEPÀTICA.

Anna Rull Aixa
DL: T-1516-2011

IV *DISCUSSIÓ i CONCLUSIONS*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLAMACIÓ COM A NEXE D'UNIÓ ENTRE OBESITAT I COMPLICACIONS METABÒLIQUES: ESTEATOSI
HEPÀTICA.

Anna Rull Aixa
DL: T-1516-2011

Tradicionalment, la secreció de quimioquines i l'activació dels receptors associats s'havia considerat un mecanisme de defensa enfront a la inflamació per la seva capacitat de conduir molècules del sistema immune al lloc de dany cel·lular [91]. És el cas de MCP-1 (I-CAPÍTOL 3), una proteïna quimioatracent de monòcits descoberta per les seves funcions immunològiques i sobretot pel seu paper fonamental en el trànsit de monòcits a la lesió arterioscleròtica [111,151]. Originalment, MCP-1 va ser descrita com una proteïna que mitjançant l'activació del seu receptor de membrana CCR2, promouia l'adhesió dels monòcits circulants a través de l'endoteli, participava en el reclutament d'aquests a l'espai sub-endotelial i contribuïa a la diferenciació de macròfags cap a cèl·lules escumoses [152,153]. Va ser al cap d'uns anys quan es va evidenciar que aquesta proteïna també podia estar involucrada en els processos metabòlics [106], especialment en l'obesitat i la resistència a la insulina. Estudis contemporanis al nostre laboratori, suggerien una relació entre la reducció de la quantitat de macròfags infiltrats en el teixit adipós de ratolins obesos deficientes en MCP-1 [123] i CCR2 [154], i la concomitant resistència a la insulina present en aquests animals. Resultats que s'havien de sumar a un tercer estudi on es considerava que la sobre-expressió de MCP-1 en el teixit adipós era la causa del reclutament de macròfags i la resistència a la insulina [155]. No obstant, un altre grup [127] postulava al mateix temps que l'absència de MCP-1 no era un requisit limitant per la infiltració de macròfags al teixit adipós en animals obesos, suggerint que MCP-1 tenia una funció que anava més enllà del seu efecte quimioatracent, coincidint amb l'objectiu del primer treball presentat en aquesta Tesi (ESTUDI 1). Particularment, en aquest estudi ens vam adonar que la deficiència de MCP-1 tenia efectes en el metabolisme de la glucosa i dels lípids. En condicions on la dieta no era un factor influent en les modificacions metabòliques però sí la hiperlipèmia, per la deficiència del receptor de les LDL, la pèrdua de MCP-1 no afectava el pes d'aquests animals però sí influïa negativament en el metabolisme dels lípids. Els resultats indicaven que l'augment de colesterol i triglicèrids plasmàtics, deguts a un enriquiment del colesterol i triglicèrids de les lipoproteïnes, només és produïa quan aquests animals també presentaven hiperlipèmia, i per tant s'establí una connexió directa entre la proteïna MCP-1 i el receptor LDL. Un increment en la concentració de lípids plasmàtics es pot associar o bé a un increment en la producció o bé a un defecte en l'aclariment, o simplement una combinació de tots dos.

IV Discussió i Conclusions

Els resultats van evidenciar que hi havia un augment en la producció de partícules VLDL tant en el cor com en el fetge dels animals amb deficiència de MCP-1, una situació comú en els pacients que presenten resistència a la insulina. Un increment de la concentració d'àcids grassos en el fetge pot causar resistència a la insulina perifèrica, que propicia a la disminució de la captació d'àcids grassos en el teixit adipós i que promou de nou un increment d'àcids grassos circulants [156,157]. Per altra banda, els resultats obtinguts en l'anàlisi de l'activitat lipoproteïna lipasa (LPL) avalaven un empitjorament en la regulació de la glucosa i la insulina, donat que un defecte en l'alliberament i emmagatzematge d'àcids grassos en el teixit adipós alteren el metabolisme de la glucosa [158,159]. De fet, a l'explorar el metabolisme de la glucosa, vam veure que MCP-1 era important tant pel metabolisme dels lípids com de la glucosa i que el seu paper depenia dels factors de risc del metabolisme, com la hiperlipèmia i la ingesta de greix i colesterol a la dieta. I encara que només suggerents, els dades indicaven que les concentracions circulants de MCP-1 podien exercir funcions endocrines en diferents teixits.

Els resultats obtinguts en el model LDLr^{-/-} confirmaven el treball presentat per el grup de *Inouye et al* [127]. Tot i que el nostre treball evidenciava efectes contraris que depenien de la dieta, de la hiperlipèmia, de l'edat i possiblement de l'obesitat induïda per la dieta. En condicions normals, on no hi ha aparentment una infiltració important de macròfags en els teixits, MCP-1 és responsable de la disminució de l'aclariment de les lipoproteïnes així com de l'empitjorament del metabolisme de la glucosa. Contràriament, quan hi havia una evident infiltració de macròfags, propiciada per l'abús de greix i colesterol a la dieta, l'absència de MCP-1 actuava com a factor modulador de l'empitjorament del metabolisme de la glucosa i dels lípids. D'aquesta manera, concloïem que MCP-1 té un paper intens i rellevant en el metabolisme, lluny de ser definit per la multitud de processos i vies de senyalització probablement involucrades. Tanmateix, evidenciàvem la necessitat d'estudiar en conjunt les relacions entre absència o presència d'inflamació i/o hiperlipèmia, l'acció de citoquines pro-inflamatòries i les conseqüències metabòliques de la dieta, l'estrès fisiològic cel·lular i la resistència a la insulina [6]. En resum, estudiar l'estreta relació entre inflamació i metabolisme amb la idea que tots dos processos estan estretament connectats i que la regulació dels quals requereix la coordinació de múltiples teixits (I-CAPÍTOL 1). En aquest sentit, un dels òrgans a ser estudiat és el fetge per ser el coordinador de l'homeòstasi energètica de tot l'organisme (I-CAPÍTOL 2). Degut a la seva implicació tant en el metabolisme de lípids com de la glucosa es va convertir en l'òrgan diana per seguir l'estudi de MCP-1 en el metabolisme. D'aquí que en el segon estudi

(Estudi 2) ens plantegéssim estudiar el paper de MCP-1 en el desenvolupament de l'esteatosi hepàtica en el model animal que ja coneixem, el model LDLr^{-/-}, i que sabem que amb una intervenció dietètica de greix i colesterol empitjorava la hiperlipèmia present de base i acabava presentant efectes metabòlics importants [Estudi 1; 150].

El greix i colesterol de la dieta, freqüent en l'alimentació actual del països desenvolupats, és un inductor de l'expressió gènica de MCP-1 en el teixit hepàtic que es veu avalada per un increment qualitatiu de l'expressió proteica de MCP-1 (avaluació histològica amb tècniques immunoquímiques) en els hepatòcits i que es relaciona amb un increment de la concentració de MCP-1 en plasma i homogenat de teixit hepàtic (determinació realitzada amb la tècnica ELISA). Un efecte que no apareix quan s'explora aquest mateix model animal en condicions dietètiques normal. Així doncs, podem dir que la sobre-regulació de MCP-1 no està associada a l'efecte de la hiperlipèmia provocada per una deficiència en el receptor de les LDL però sí a l'estrès metabòlic produït per la dieta, responsable d'un empitjorament en el metabolisme de la glucosa i dels lípids. Particularment, aquest excés de nutrients incrementa la predisposició a l'augment de pes i a la presència de resistència a la insulina. Els nostres resultats indiquen una forta associació, que resulta ser dosi-depenent, entre l'expressió hepàtica de MCP-1 i l'extensió i gravetat de l'esteatosi hepàtica. Tanmateix, la troballa de MCP-1 al voltant de les gotes de lípids, característiques de l'esteatosi hepàtica, avalen el possible paper determinant de l'expressió de MCP-1 hepàtica en l'associació entre l'acumulació citoplasmàtica de lípids en els hepatòcits i la síndrome metabòlica [160]. Una completa deficiència de MCP-1 és gairebé determinant en la prevenció de l'esteatosi hepàtica en aquest models, que en el cas de ser parcial (model heterozigot per MCP-1) també es manté controlada.

De les dades obtingudes suggerim el fetge com a major contribuent de la concentració de MCP-1 en plasma, i tot i que no en podem dir les fonts cel·lulars exactes també hem d'afirmar que probablement hi troben implicats altres òrgans. Concretament no podem passar per alt el paper del teixit adipós, prèviament ja establert [115,119,121]. Així doncs, cal especificar que aquestes relacions fan que l'expressió hepàtica de MCP-1 estès involucrada en un complex entramat metabòlic on hi actuessin múltiples factors de transcripció. De les nostres observacions, podem confirmar resultats previs *in vitro* que indicaven que MCP-1 podia induir l'acumulació de lípids en els hepatòcits via activació de l'expressió de gens de la família dels PPARs, concretament PPAR α [161]. Les diferències en l'expressió de PPAR α i PPAR γ corroboren estudis previs que indiquen la implicació d'aquests receptors en la regulació de múltiples gens lipogènics [162], i en els que MCP-1

IV Discussió i Conclusions

tindria un paper important [163]. Les diferències observades en l'expressió de PPAR β/δ són més complicades d'entendre donat que la implicació d'aquest factor en el metabolisme dels lípids i la glucosa ha estat menys explorada, i les dades que es tenen són relativament recents [164]. Una sobre-expressió de PPAR β/δ en els hepatòcits i el tractament amb antagonistes de PPAR β/δ reduïrien de forma significativa l'acumulació intracel·lular de lípids. D'acord amb aquest concepte, la disminució en la expressió de PPAR β/δ en el model LDLr^{-/-} contribuiria al desenvolupament de l'esteatosi hepàtica, tot i que serien necessaris més estudis per poder-ne fer una afirmació clara.

Per altra banda també cal destacar el possible paper que tindria la concentració de MCP-1 circulant en els diferents teixits perifèrics i la conseqüent contribució a les diferents patologies associades amb la síndrome metabòlica. La disfunció metabòlica observada en el nostre model és conseqüència de l'excés de nutrients que propicien un estat inflamatori i que probablement potencien la secreció de múltiples citoquines. Aquestes molècules podrien tenir l'habilitat d'influir en el metabolisme energètic de l'organisme a més a més d'actuar com a mediadors inflamatoris, degut a la seva ràpida distribució tissular mitjançant la circulació. I per tant, aquesta doble funcionalitat de MCP-1, tant de medidora en la inflamació com en els processos metabòlics, suposaria que la concentració plasmàtica de MCP-1 podria convertir-se en candidata a ser un factor comú en els desordres metabòlics [119, I-CAPÍTOL 3, ESTUDI 1]. Tanmateix, hem de tenir en compte que la sobre-expressió de MCP-1 en el teixit hepàtic, induïda per un excés de greix i colesterol a la dieta, contribueix al desenvolupament d'esteatosi hepàtica, una troballa important per entendre les complicacions associades a la síndrome metabòlica, donat que com ja hem vist el fetge és l'òrgan principal en la regulació de l'homeòstasi energètica (I-CAPÍTOL 2) i es troba en continua exposició a dietes inapropiades. De fet, val la pena recordar que l'esteatosi hepàtica és la manifestació hepàtica de la síndrome metabòlica, i tot i estar considerada com una malaltia benigne i reversible, la progressió d'esteatosi a esteatohepatitis representa un pas clau en el desenvolupament de malalties cròniques associades més complexes i extremadament perjudicials, com fibrosis, cirrosi o fins i tot càncer [84,165]. Processos en els quals la implicació de MCP-1 podria tenir molt a veure per la seva participació en diversos processos metabòlics. És per això que vam proposar posar a punt l'exploració del fetge a nivell metabòlic (Annex 3), amb tècniques de ressonància magnètica nuclear, ja que petites variacions en el metabolisme suposen canvis importants en les concentracions dels metabòlits implicats en les diverses vies metabòliques. L'objectiu era poder detectar els canvis generats per MCP-1 en el fetge,

per poder-ne detectar les vies metabòliques implicades, estudiar-ne el seu efecte, i així poder proposar dianes terapèutiques reals on el tractament d'un metabolisme específic no acabi essent perjudicial per a un altre. És per aquest motiu que primer vam voler caracteritzar els metabòlits implicats en la progressió d'esteatosi hepàtica induïda per la dieta, així com els metabòlits implicats en la progressió d'esteatosi hepàtica a esteatohepatitis (ESTUDI 3) en el model LDLr^{-/-}.

L'anàlisi metabòmic del fetge va confirmar que el colesterol de la dieta té un efecte molt important en la composició dels àcids grassos emmagatzemats al teixit hepàtic. Particularment, es va trobar una disminució del quocient obtingut entre els àcids grassos poliinsaturats i els àcids grassos monoinsaturats (PUFA/MUFA), que indicaria un excés de peroxidació de lípids i estrés oxidatiu [166]. Una troballa que confirmaria dades trobades en estudis clínics de pacients obesos amb esteatosis hepàtica [167,168]. Tanmateix, la disminució significativa de PUFA indica una reducció en l'oxidació d'àcids grassos i l'alliberament de triglicèrids per part del fetge, que resulta en un increment en la síntesi de triglicèrids que contribueix significativament al desenvolupament de l'acumulació de triglicèrids en els hepatòcits [167].

Les condicions dietètiques utilitzades en el nostre estudi mostraven variacions en el metabolisme que suggereixen que la 12/15LO o les molècules relacionades empitjorarien aquesta situació. L'esteatosi, induïda per la dieta rica en greix, genera un estat d'inflamació en el fetge que suposa el reclutament de macròfags cap a aquest òrgan. De tots els gens candidats que regulen la inflamació en els teixits, s'ha proposat recentment que la 12/15LO seria una de les molècules involucrades. Les cèl·lules amb sobre-expressió de 12/15LO secreten potents quimioquines, particularment MCP-1, i els ratolins deficients en la 12/15LO no presenten canvis induïts per la dieta en els diferents òrgans [126]. De fet, s'ha vist que la família dels enzims de la 12/15LO tenen un paper clau en el metabolisme dels àcids grassos. La 12/15LO catalitza la inserció de les molècules d'oxigen en l'àcid araquidònic (ARA) donant com a resultat l'àcid hidroperòxid i l'oxigenació de l'àcid linoleic 18:2 (n=6). Així doncs, els àcids grassos lliures insaturats i els àcids grassos esterificats en fosfolípids i esters de colesterol són substrats per la 12/15LO [169].

En quant a la resta de metabòlits, vam trobar una disminució de les concentracions hepàtiques de metionina en comparació als valors basals, que no depenien de l'efecte de la dieta. Un fenomen acompanyat per una disminució significant de les concentracions de glutatió, taurina i carnitina en animals alimentats amb una dieta rica en greix i colesterol. Tant la taurina com el glutatió són productes del metabolisme de la metionina en la via S-

IV Discussió i Conclusions

adenosyl-L-metiona (SAME) i les vies de transsulfuració. I per tant, la disminució d'aquest metabòlits juntament amb la disminució de les concentracions de metionina suggereixen que aquestes dues vies metabòliques estan probablement disminuïdes degut a les condicions dietètiques. Una relació que és fa més evident quan els processos d'inflamació estan activats, un fenomen avalat per la teoria que les concentracions de SAME són fonamentals per mantenir el balanç entre les citoquines pro-inflamatòries i anti-inflamatòries en la patogènesis del fetge [170]. Per altra banda, les concentracions de taurina, glutatió i carnitina estarien relacionades a altres vies. Concretament, la taurina està vinculada a l'activitat de la CYP7A1 hepàtica (colesterol-7 α -hidrolasa), un enzim clau en el procés d'excreció de colesterol i la síntesi d'àcids biliars. De fet, en una primera aproximació en l'avaluació de l'efecte de MCP-1 vam trobar que la disminució de l'esteatosi hepàtica en el model MCP-1^{-/-}/LDLr^{-/-} podria explicar-se per un increment de l'activitat CYP7A1 induïda per un increment en les concentracions hepàtiques de taurina (Annex 3).

Aquest resultat indicaven que 1) el colesterol de la dieta és un factor important en el desenvolupament de l'esteatosi hepàtica, probablement pel impacte en el metabolisme general dels àcids grassos degut a una disfunció mitocondrial i 2) que és el causant de la inflamació hepàtica. Però sobretot, aquests resultats en serveixen com a base per poder entendre el paper de MCP-1 en l'esteatosi hepàtica (APARTAT VI) i en la inflamació, i per tant el paper de la inflamació com a nexa d'unió en les complicacions metabòliques.

CONCLUSIONS

1. La proteïna quimioattractant de monòcits 1 (MCP-1) intervé en la inflamació i en l'homeòstasi metabòlica
2. MCP-1 intervé en el metabolisme del lípids i de la glucosa, i la seva funció està condicionada per la presència d'hiperlipèmia així com per la ingesta de greix i colesterol a la dieta
3. L'expressió hepàtica de MCP-1 està induïda per la ingesta de greix i colesterol, i contribueix al desenvolupament de l'esteatosi hepàtica en aquest model animal
4. En l'esteatosi i la inflamació hepàtica d'aquest model, el colesterol de la dieta és el factor més rellevant
5. De entre tots els metabòlits estudiats en l'esteatosi hepàtica, en destaquen els nivells de PUFA/MUFA, així com les concentracions de taurina, glutatió, metionina i carnitina
6. En l'esteatosi hepàtica d'aquest model, els processos de metilació i sulfuració estan alterats
7. Un metabolisme controlat necessita una quantitat justa de MCP-1 i per tant MCP-1 pot ser considerada com a diana terapèutica

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLAMACIÓ COM A NEXE D'UNIÓ ENTRE OBESITAT I COMPLICACIONS METABÒLIQUES: ESTEATOSI
HEPÀTICA.

Anna Rull Aixa
DL: T-1516-2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLAMACIÓ COM A NEXE D'UNIÓ ENTRE OBESITAT I COMPLICACIONS METABÒLIQUES: ESTEATOSI
HEPÀTICA.

Anna Rull Aixa
DL: T-1516-2011

V REFERÈNCIES

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLAMACIÓ COM A NEXE D'UNIÓ ENTRE OBESITAT I COMPLICACIONS METABÒLIQUES: ESTEATOSI
HEPÀTICA.

Anna Rull Aixa
DL: T-1516-2011

REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

1. Hotamisligil GS. *Inflammation and metabolic disorders*. Nature 2006; 444: 860-7.
2. Wellen E and Hotamisligil G.S. *Inflammation, stress and diabetes*. J. Clin. Invest. 2005; 115: 1111-9.
3. Medhitov R. *Origin and physiological roles of inflammation*. Nature 2008; 7203: 428-35.
4. Chandra RK. *Nutrition, immunity and infection: from basis knowledge of dietary manipulation of immune response to practical application of ameliorating suffering and improving survival*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1996; 93: 14304-7.
5. Rull A, Camps J, Alonso-Villaverde C, Joven J. *Insulin resistance, Inflammation, and Obesity: Role of Monocyte Chemoattractant Protein-1 (or CCL2) in the Regulation of Metabolism*. Mediatos of Inflammation 2010; 326580.
6. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. *Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance*. Science 1993; 259: 87-91.
7. 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; 2409-15.
8. Saghizadeh M, Ong JM, Garvey WT, Henry RR, Kern PA. *The expression of TNF alpha by human muscle. Relationship to insulin resistance*. J Clin Invest. 1996; 97:1111-6.
9. Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. *Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function*. Nature 1997; 389:610-4.
10. Navab M, Anantharamaiah GM, Reddy ST, Van Lenten BJ, Ansell BJ, Fogelman AM. *Mechanisms of disease: proatherogenic HDL-an evolving field*. Nat Clin Pract Endocrinol Metab. 2006; 9: 504-11.
11. Camps J, Marsillach J, Joven J. *The paraoxonases: role in human diseases and methodological difficulties in measurement*. Crit Rev Clin Lab Sci. 2009; 46: 83-106.
12. Turnbull AV, Rivier CL. *Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action*. Physiol Rev. 1999; 79: 1-71.
13. Gordon S, Taylor PR. *Monocyte and macrophage heterogeneity*. Nat Rev Immunol. 2005; 5: 953-964.
14. Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Egashira K, Kasuga M. *MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity*. J Clin Invest. 2006 Jun; 116:1494-505.
15. Majno G, Joris I. *Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death*. Am J Pathol. 1995; 146: 3-15.
16. Henson PM, Hume DA. *Apoptotic cell removal in development and tissue homeostasis*. Trends Immunol. 2006; 27: 244-50.
17. Wellen KE, Hotamisligil GS. *Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue*. J. Clin. Invest. 2003; 112: 1785-1788.
18. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Gorgun C, Glimcher LH, Hotamisligil GS. *Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes*. Science 2004; 306:457-61.
19. Hummasti S, Hotamisligil GS. *Endoplasmic reticulum stress and inflammation in obesity and diabetes*. Circ Res. 2010; 107:579-91.
20. Ron D, Walter P. *Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response*. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007; 8:519-29.
21. Schröder M, Kaufman RJ. *The mammalian unfolded protein response*. Annu Rev Biochem. 2005; 74:739-89.
22. Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. *Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the*

 Referències Bibliogràfiques

- unfolded-protein response*. Nat Cell Biol. 2000; 2:326-32.
23. Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D. *Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response*. Mol Cell 2000; 5:897-904.
 24. Ye J, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Davé UP, Prywes R, Brown MS, Goldstein JL. *ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs*. Mol Cell 2000; 6:1355-64.
 25. Tuncman G, Hirosumi J, Solinas G, Chang L, Karin M, Hotamisligil GS. *Functional in vivo interactions between JNK1 and JNK2 isoforms in obesity and insulin resistance*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006; 103:10741-6.
 26. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Görgün CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS. *A central role for JNK in obesity and insulin resistance*. Nature 2002; 420:333-6.
 27. Houstis N, Rosen ED, Lander ES. *Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance*. Nature 2006; 440:944-8.
 28. Zhang K, Shen X, Wu J, Sakaki K, Saunders T, Rutkowski DT, Back SH, Kaufman RJ. *Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response*. Cell. 2006; 124:587-99.
 29. Reiling JH, Sabatini DM. *Stress and mTOR signaling*. Oncogene. 2006; 25:6373-83.
 30. Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, Tanaka K, Cuervo AM, Czaja MJ. *Autophagy regulates lipid metabolism*. Nature. 2009; 458:1131-5.
 31. Singh R, Xiang Y, Wang Y, Baikati K, Cuervo AM, Luu YK, Tang Y, Pessin JE, Schwartz GJ, Czaja MJ. *Autophagy regulates adipose mass and differentiation in mice*. J Clin Invest. 2009; 119:3329-39.
 32. Gordon S, Taylor PR. *Monocyte and macrophage heterogeneity*. Nat Rev Immunol. 2005; 5:953-64.
 33. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. *The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization*. Trenes Immunol. 2004; 25:677-86.
 34. Lumeng CN, Saltiel AR. *Inflammatory links between obesity and metabolic disease*. J Clin Invest. 2011; 121: 2111-17.
 35. Odegaard JI, Chawla A. *Alternative macrophage activation and metabolism*. Annu Rev Pathol. 2011; 6:275-97.
 36. Donath MY, Boni-Schnetzler M, Ellingsgaard H, Halban PA, Ehses JA. *Cytokine production by islets in health and diabetes: cellular origin, regulation and function*. Trends Endocrinol Metab. 2010; 21:261-267.
 37. Ehses JA, Perren A, Eppler E, Ribaux P, Pospisilik JA, Maor-Cahn R, Gueripel X, Ellingsgaard H, Schneider MK, Biollaz G, Fontana A, Reinecke M, Homo-Delarche F, Donath MY. *Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes*. Diabetes. 2007; 56:2356-70.
 38. Strissel KJ, Stancheva Z, Miyoshi H, Perfield JW 2nd, DeFuria J, Jick Z, Greenberg AS, Obin MS. *Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications*. Diabetes 2007; 56:2910-8.
 39. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, Otsu M, Hara K, Ueki K, Sugiura S, Yoshimura K, Kadowaki T, Nagai R. *CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity*. Nat Med. 2009; 15:914-20.
 40. Thaler JP, Schwartz MW. *Minireview: Inflammation and obesity pathogenesis: the hypothalamus heats up*. Endocrinology 2010; 151: 4109-20.
 41. Purkayastha S, Zhang H, Ahmed Z, Wang Y, Cai D. *Neuronal dysregulation of peripheral insulin action and blood pressure by brain endoplasmic reticulum stress*. Prod Natl Acad Sci USA 2011; 108: 2939-44.
 42. Wang YY, Lin SY, Chuang YH, Chen CJ, Tung KC, Sheu WH. *Adipose proinflammatory cytokine expression through sympathetic system is associated with hyperglycemia and insulin resistance in rat ischemic stroke model*. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2011; 300: E155-E163.
 43. Hong EG, Ko HJ, Cho YR, Kim HJ, Ma Z, Yu TY, Friedline RH, Kurt-Jones E, Finberg R,

- Fischer MA, Granger EL, Norbury CC, Hauschka SD, Philbrick WM, Lee CG, Elias JA, Kim JK. *Interleukin-10 prevents diet-induced insulin resistance by attenuating macrophage and cytokine response in skeletal muscle*. *Diabetes* 2009; 58:2525-35.
44. Fabbrini E, Magkos F, Mohammed BS, Pietka T, Abumrad NA, Patterson BW, Okunade A, Klein S. *Intrahepatic fat, not visceral fat, is linked with metabolic complications of obesity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106:15430-5.
45. Kremer M, Hines IN, Milton RJ, Wheeler MD. *Favored T helper 1 response in a mouse model of hepatosteatosis is associated with enhanced T cell-mediated hepatitis*. *Hepatology* 2006; 44: 216-27.
46. Baffy G. *Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease*. *J Hepatol*. 2009; 51: 212-23.
47. Arias IM, Alter HJ, Boyer JL, Cohen DE, Fausto N, Shafritz DA, Wolkoff AW. *The liver biology and pathology (5th edition)*. John Wiley & sons Ltd. 2009.
48. Postic C, Girard J. *Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice*. *J Clin Invest*. 2008; 118:829-38.
49. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. *SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver*. *J Clin Invest*. 2002; 109:1125-31.
50. Kalaany NY, Mangelsdorf DJ. *LXRS and FXR: the yin and yang of cholesterol and fat metabolism*. *Annu Rev Physiol*. 2006; 68:159-91.
51. Yamashita H, Takenoshita M, Sakurai M, Bruick RK, Henzel WJ, Shillinglaw W, Arnot D, Uyeda K. *A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98:9116-21.
52. Kabashima T, Kawaguchi T, Wadzinski BE, Uyeda K. *Xylulose 5-phosphate mediates glucose-induced lipogenesis by xylulose 5-phosphate-activated protein phosphatase in rat liver*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100:5107-12.
53. Cha JY, Repa JJ. *The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR*. *J Biol Chem*. 2007; 282:743-51.
54. Mitro N, Mak PA, Vargas L, Godio C, Hampton E, Molteni V, Kreuzsch A, Saez E. *The nuclear receptor LXR is a glucose sensor*. *Nature*. 2007; 445:219-23.
55. Lin J, Yang R, Tarr PT, Wu PH, Handschin C, Li S, Yang W, Pei L, Uldry M, Tontonoz P, Newgard CB, Spiegelman BM. *Hyperlipidemic effects of dietary saturated fats mediated through PGC-1beta coactivation of SREBP*. *Cell*. 2005; 120:261-73.
56. Doege H, Grimm D, Falcon A, Tsang B, Storm TA, Xu H, Ortegon AM, Kazantzis M, Kay MA, Stahl A. *Silencing of hepatic fatty acid transporter protein 5 in vivo reverses diet-induced non-alcoholic fatty liver disease and improves hyperglycemia*. *J Biol Chem*. 2008; 283:22186-92.
57. Wolfrum C, Stoffel M. *Coactivation of Foxa2 through Pgc-1beta promotes liver fatty acid oxidation and triglyceride/VLDL secretion*. *Cell Metab*. 2006; 3:99-110.
58. Wolfrum C, Asilmaz E, Luca E, Friedman JM, Stoffel M. *Foxa2 regulates lipid metabolism and ketogenesis in the liver during fasting and in diabetes*. *Nature*. 2004; 432:1027-32.
59. Parks EJ, Parks EJ. *Changes in fat synthesis influenced by dietary macronutrient content*. *Proc Nutr Soc*. 2002; 61:281-6.
60. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Imai Y, Shimozawa N, Hioki K, Uchida S, Ito Y, Takakuwa K, Matsui J, Takata M, Eto K, Terauchi Y, Komeda K, Tsunoda M, Murakami K, Ohnishi Y, Naitoh T, Yamamura K, Ueyama Y, Froguel P, Kimura S, Nagai R, Kadowaki T. *Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and ApoE-deficient mice from atherosclerosis*. *J Biol Chem*. 2003; 278:2461-8.
61. Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K. *Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome*. *J Clin Invest*. 2006; 116:1784-92.
62. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S,

V Referències Bibliogràfiques

- Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T. *Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase*. Nat Med. 2002; 8:1288-95.
63. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE. *Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action*. J Clin Invest. 2001; 108:1167-74.
64. Hardie DG. *Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status*. Endocrinology. 2003; 144:5179-83.
65. Towler MC, Hardie DG. *AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling*. Circ Res. 2007; 100:328-41.
66. de Almeida IT, Cortez-Pinto H, Fidalgo G, Rodrigues D, Camilo ME. *Plasma total and free fatty acids composition in human non-alcoholic steatohepatitis*. Clin Nutr. 2002; 21:219-23.
67. Choudhury J, Sanyal AJ. *Insulin resistance and the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease*. Clin Liver Dis. 2004; 8:575-94.
68. Utschneider KM, Kahn SE. Review: *The role of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease*. J Clin Endocrinol Metab. 2006; 91:4753-61.
69. Valenti L, Rametta R, Dongiovanni P, Maggioni M, Fracanzani AL, Zappa M, Lattuada E, Roviario G, Fargion S. *Increased expression and activity of the transcription factor FOXO1 in nonalcoholic steatohepatitis*. Diabetes. 2008; 57:1355-62.
70. Kamagate A, Dong HH. *FoxO1 integrates insulin signaling to VLDL production*. Cell Cycle. 2008; 7:3162-70.
71. Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, Shoelson SE. *Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB*. Nat Med. 2005; 11:183-90.
72. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. *An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest*. Nature. 2006; 444:1027-31.
73. Bäckhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI. *Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007; 104:979-84.
74. Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. *Obesity alters gut microbial ecology*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005; 102:11070-5.
75. Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich CF, Gordon JI. *The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004; 101:15718-23.
76. Towle HC. *Glucose and cAMP: adversaries in the regulation of hepatic gene expression*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001; 98:13476-8.
77. Yoshida K, Shimizugawa T, Ono M, Furukawa H. *Angiopoietin-like protein 4 is a potent hyperlipidemia-inducing factor in mice and inhibitor of lipoprotein lipase*. J Lipid Res. 2002; 43:1770-2.
78. Dumas ME, Barton RH, Toye A, Cloarec O, Blancher C, Rothwell A, Fearnside J, Tatoud R, Blanc V, Lindon JC, Mitchell SC, Holmes E, McCarthy MI, Scott J, Gauguier D, Nicholson JK. *Metabolic profiling reveals a contribution of gut microbiota to fatty liver phenotype in insulin-resistant mice*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006; 103:12511-6.
79. Rinella ME, Elias MS, Smolak RR, Fu T, Borensztajn J, Green RM. *Mechanisms of hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methionine choline-deficient diet*. J Lipid Res. 2008; 49:1068-76.
80. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C, Waget A, Delmée E, Cousin B, Sulpice T, Chamontin B, Ferrières J, Tanti JF, Gibson GR, Castella L, Delzenne NM, Alessi MC, Barcelin R. *Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance*. Diabetes. 2007; 56:1761-72.
81. Aderem A, Ulevitch RJ. *Toll-like receptors in the induction of the innate immune response*. Nature. 2000; 406:782-7.
82. Ajuwon KM, Spurlock ME. *Palmitate activates the NF-kappaB transcription*

- factor and induces IL-6 and TNF α expression in 3T3-L1 adipocytes.* J Nutr. 2005; 135:1841-6.
83. Hijona E, Hijona L, Arenas JI, Bujanda L. *Inflammatory mediators of hepatic steatosis.* Mediators Inflamm. 2010; 2010:837419.
 84. Tiniakos DG, Vos MB, Brunt EM. *Nonalcoholic fatty liver disease: pathology and pathogenesis.* Annu Rev Pathol. 2010; 5:145-71.
 85. Begriche K, Igoudjil A, Pessayre D, Fromenty B. *Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it.* Mitochondrion. 2006; 6:1-28.
 86. Mari M, Caballero F, Colell A, Morales A, Caballeria J, Fernandez A, Enrich C, Fernandez-Checa JC, Garcia-Ruiz C. *Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis.* Cell Metab. 2006; 4:185-98.
 87. Guicciardi ME, Leist M, Gores GJ. *Lysosomes in cell death.* Oncogene. 2004; 23:2881-90.
 88. Kaufman RJ. *Orchestrating the unfolded protein response in health and disease.* J Clin Invest. 2002; 110:1389-98.
 89. Marra F, Gastaldelli A, Svegliati Baroni G, Tell G, Tiribelli C. *Molecular basis and mechanisms of progression of non-alcoholic steatohepatitis.* Trends Mol Med. 2008;14:72-81.
 90. Baggiolini M. *Chemokines and leukocyte traffic.* Nature 1998; 392: 565-568.
 91. Luster AD. *Chemokines - chemotactic cytokines that mediate inflammation.* N Engl J Med 1998; 338: 436-445.
 92. Charo IF, Ransohoff RM. *The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation.* N Engl J Med 2006; 354: 610-621.
 93. Van Coillie E, Van Damme J, Opdenakker G. *The MCP/eotaxin subfamily of CC chemokines.* Cytokine Growth Factor Rev 1999; 10: 61-86.
 94. Yoshimura T, Robinson EA, Tanaka S, Appella E, Kuratsu J, Leonard EJ. *Purification and amino acid analysis of two human glioma-derived monocyte chemoattractants.* J Exp Med. 1989; 169:1449-59.
 95. Van Damme J, Proost P, Put W, Arens S, Lenaerts JP, Conings R, Opdenakker G, Heremans H, Billiau A. *Induction of monocyte chemotactic proteins MCP-1 and MCP-2 in human fibroblasts and leukocytes by cytokines and cytokine inducers. Chemical synthesis of MCP-2 and development of a specific RIA.* J Immunol. 1994; 152:5495-502.
 96. Minty A, Chalon P, Guillemot JC, Kaghad M, Liauzun P, Magazin M, Miloux B, Minty C, Ramond P, Vita N, et al. *Molecular cloning of the MCP-3 chemokine gene and regulation of its expression.* Eur Cytokine Netw. 1993; 4:99-110.
 97. Berkhout TA, Sarau HM, Moores K, White JR, Elshourbagy N, Appelbaum E, Reape RJ, Brawner M, Makwana J, Foley JJ, Schmidt DB, Imburgia C, McNulty D, Matthews J, O'Donnell K, O'Shannessy D, Scott M, Groot PH, Macphee C. *Cloning, in vitro expression, and functional characterization of a novel human CC chemokine of the monocyte chemotactic protein (MCP) family (MCP-4) that binds and signals through the CC chemokine receptor 2B.* J Biol Chem. 1997; 272:16404-13.
 98. Sarafi MN, Garcia-Zepeda EA, MacLean JA, Charo IF, Luster AD. *Murine monocyte chemoattractant protein (MCP)-5: a novel CC chemokine that is a structural and functional homologue of human MCP-1.* J Exp Med. 1997; 185:99-109.
 99. Boekhoudt GH, Guo Z, Beresford GW, Boss JM. *Communication between NF-kappa B and Sp1 controls histone acetylation within the proximal promoter of the monocyte chemoattractant protein 1 gene.* J Immunol. 2003 Apr 15; 170:4139-47.
 100. Kumar SN, Boss JM. *Site A of the MCP-1 distal regulatory region functions as a transcriptional modulator through the transcription factor NF1.* Mol Immunol 2000; 37: 623-632.
 101. Sung FL, Zhu TY, Au-Yeung KK, Siow YL, O K. *Enhanced MCP-1 expression during ischemia/reperfusion injury is mediated by oxidative stress and NF-kappaB.* Kidney Int. 2002; 62:1160-70.

V Referències Bibliogràfiques

102. Nelken N.A., Coughlin S.R., Gordon D., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques*. J Clin Invest 1991; 88: 1121-1127
103. Gerzten R.E., Garcia-Zepeda E.A., Lim Y.C., et al. *MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions*. Nature 1999; 398: 718-723.
104. Tabata T., Mine S., Kawahara C., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 induces scavenger receptor expression and monocyte differentiation into foam cells*. Biochem Biophys Res Commun 2003; 305: 380-385.
105. Viedt C., Vogel J., Athanasiou T., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 induces proliferation and IL-6 production in human smooth muscle cells by differential activation of NF-kappaB and activator protein-1*. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2002; 22: 914-920.
106. de Lemos J.A., Morrow D.A., Sabatine M., et al., *Association between plasma levels of MCP-1 and long term clinical outcomes in patients with acute coronary syndromes*. Circulation 2003;107: 690-695.
107. Deo R., Khera A., McGuire D.K., et al., *Association among plasma MCP-1, cardiovascular risk factors and subclinical atherosclerosis*. J Am Coll Cardiol 2004; 44: 1812-1818.
108. Alonso-Villaverde C., Coll B., Parra S., et al., *Atherosclerosis in patients infected with HIV is influenced by a mutant monocyte chemoattractant protein-1 allele*. Circulation. 2004; 110(15):2204-2209.
109. Rull A, García R, Fernández-Sender L, Beltrán-Debón R, Aragonès G, Alegret JM, Alonso-Villaverde C, Mackness B, Mackness M, Camps J, Martín-Paredero V, Joven J. *The Role of Combined Assessment of Defense Against Oxidative Stress and Inflammation in the Evaluation of Peripheral Arterial Disease*. Curr Mol Med. 2011
110. Boring L., Gosling J., Cleary M., et al., *Decreased lesion formation in CCR2-/- mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis*. Nature 1998; 394: 894-897.
111. Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, Rollins BJ. *Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice*. Mol Cell. 1998; 2:275-81.
112. Inoue S., Egashira K., Ni W., et al., *Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy limits progression and destabilization of established atherosclerosis in ApoE knockout mice*. Circulation 2002; 106: 2700-2706.
113. Aiello R.J., Bourassa P.A., Lindsey S., *MCP-1 accelerates atherosclerosis in ApoE deficient mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999; 19: 1518-1525.
114. Rull A, Beltrán-Debón R, Aragonès G, Rodríguez-Sanabria F, Alonso-Villaverde C, Camps J, Joven J. *Expression of cytokine genes in the aorta is altered by the deficiency in MCP-1: effect of a high-fat, high-cholesterol diet*. Cytokine. 2010; 50:121-8.
115. Chen A, Mumick S, Zhang C, Lamb J, Dai H, Weingarth D, Mudgett J, Chen H, MacNeil DJ, Reitman ML, Qian S. *Diet induction of monocyte chemoattractant protein-1 and its impact on obesity*. Obes Res. 2005; 13:1311-20.
116. Piemonti L, Leone BE, Nano R, Sacconi A, Monti P, Maffi P, Bianchi G, Sica A, Peri G, Melzi R, Aldrighetti L, Secchi A, Di Carlo V, Allavena P, Bertuzzi F. *Human pancreatic islets produce and secrete MCP-1/CCL2: relevance in human islet transplantation*. Diabetes. 2002;51:55-65.
117. Barna BP, Pettay J, Barnett GH, Zhou P, Iwasaki K, Estes ML. *Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 expression in adult human non-neoplastic astrocytes is sensitive to tumor necrosis factor (TNF) or antibody to the 55-kDa TNF receptor*. J Neuroimmunol. 1994; 50:101-7.
118. Marsillach J, Bertran N, Camps J, Ferré N, Riu F, Tous M, Coll B, Alonso-Villaverde C, Joven J. *The role of circulating monocyte chemoattractant protein-1 as a marker of hepatic inflammation in patients with chronic liver disease*. Clin Biochem. 2005; 38:1138-40.
119. Sartipy P, Loskutoff DJ. *Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and*

- insulin resistance*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003; 100:7265-70.
120. Lu B, Rutledge BJ, Gu L, Fiorillo J, Lukacs NW, Kunkel SL, North R, Gerard C, Rollins BJ. *Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice*. J Exp Med. 1998; 187:601-8.
121. Takahashi K, Mizuarai S, Araki H, Mashiko S, Ishihara A, Kanatani A, Itadani H, Kotani H. *Adiposity elevates plasma MCP-1 levels leading to the increased CD11b-positive monocytes in mice*. J Biol Chem. 2003; 278:46654-60.
122. Bruun JM, Lihn AS, Pedersen SB, Richelsen B. *Monocyte chemoattractant protein-1 release is higher in visceral than subcutaneous human adipose tissue (AT): implication of macrophages resident in the AT*. J Clin Endocrinol Metab. 2005; 90(4):2282-9.
123. Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Egashira K, Kasuga M. *MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity*. J Clin Invest. 2006; 116:1494-505.
124. Steinbrecher UP, Parthasarathy S, Leake DS, Witztum JL, Steinberg D. *Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1984; 81:3883-7.
125. Rong JX, Berman JW, Taubman MB, Fisher EA. *Lysophosphatidylcholine stimulates monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in rat aortic smooth muscle cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2002; 22:1617-23.
126. Sears DD, Miles PD, Chapman J, Ofrecio JM, Almazan F, Thapar D, Miller YI. *12/15-lipoxygenase is required for the early onset of high fat diet-induced adipose tissue inflammation and insulin resistance in mice*. PLoS One. 2009; 4:e7250.
127. Inouye KE, Shi H, Howard JK, Daly CH, Lord GM, Rollins BJ, Flier JS. *Absence of CC chemokine ligand 2 does not limit obesity-associated infiltration of macrophages into adipose tissue*. Diabetes. 2007; 56:2242-50.
128. Niu J, Kolattukudy PE. *Role of MCP-1 in cardiovascular disease: molecular mechanisms and clinical implications*. Clin Sci (Lond). 2009; 117:95-109.
129. Azfer A, Niu J, Rogers LM, Adamski FM, Kolattukudy PE. *Activation of endoplasmic reticulum stress response during the development of ischemic heart disease*. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006; 291:H1411-20.
130. Morimoto H, Takahashi M, Izawa A, Ise H, Hongo M, Kolattukudy PE, Ikeda U. *Cardiac overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in transgenic mice prevents cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction*. Circ Res. 2006; 99:891-9.
131. Zhou L, Azfer A, Niu J, Graham S, Choudhury M, Adamski FM, Younce C, Binkley PF, Kolattukudy PE. *Monocyte chemoattractant protein-1 induces a novel transcription factor that causes cardiac myocyte apoptosis and ventricular dysfunction*. Circ Res. 2006; 98:1177-85.
132. Younce CW, Kolattukudy PE. *MCP-1 causes cardiomyoblast death via autophagy resulting from ER stress caused by oxidative stress generated by inducing a novel zinc-finger protein, MCP-1*. Biochem J. 2010; 426:43-53.
133. Roca H, Varsos ZS, Mizutani K, Pienta KJ. *CCL2, survivin and autophagy: new links with implications in human cancer*. Autophagy. 2008; 4:969-71.
134. Kurihara T, Bravo R. *Cloning and functional expression of mCCR2, a murine receptor for the C-C chemokines JE and FIC*. J Biol Chem. 1996; 271:11603-7.
135. Rot A. *Contribution of Duffy antigen to chemokine function*. Cytokine Growth Factor Rev. 2005; 16: 687-94.
136. Mantovani A, Bonecchi R, Locati M. *Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more*. Nat. Rev. Immunol. 2006; 6:907-18.
137. Pruenster M, Mudde L, Bombosi P, Dimitrova S, Zsak M, Middleton J, Richmond A, Graham GJ, Segerer S, Nibbs RJ, Rot A. *The Duffy antigen receptor for chemokines transports chemokines and supports their promigratory activity*. Nat Immunol. 2009; 10:101-8.

V Referències Bibliogràfiques

138. Joven J, Coll B, Tous M, Ferré N, Alonso-Villaverde C, Parra S, Camps J. *The influence of HIV infection on the correlation between plasma concentrations of monocyte chemoattractant protein-1 and carotid atherosclerosis*. Clin Chim Acta. 2006; 368:114-9.
139. Schnabel RB, Baumert J, Barbalic M, Dupuis J, Ellinor PT, Durda P, Dehghan A, Bis JC, Illig T, Morrison AC, Jenny NS, Keaney JF Jr, Gieger C, Tilley C, Yamamoto JF, Khuseynova N, Heiss G, Doyle M, Blankenberg S, Herder C, Walston JD, Zhu Y, Vasan RS, Klopp N, Boerwinkle E, Larson MG, Psaty BM, Peters A, Ballantyne CM, Wittman JC, Hoogeveen RC, Benjamin EJ, Koenig W, Tracy RP. *Duffy antigen receptor for chemokines (Darc) polymorphism regulates circulating concentrations of monocyte chemoattractant protein-1 and other inflammatory mediators*. Blood. 2010; 115:5289-99.
140. Tateya S, Tamori Y, Kawaguchi T, Kanda H, Kasuga M. *An increase in the circulating concentration of monocyte chemoattractant protein-1 elicits systemic insulin resistance irrespective of adipose tissue inflammation in mice*. Endocrinology. 2010, 151:1336-41.
141. Dawson J, Miltz W, Mir AK, Wiessner C. *Targeting monocyte chemoattractant protein-1 signalling in disease*. Expert Opin Ther Targets. 2003; 7:35-48.
142. Ohtani K, Usui M, Nakano K, Kohjimoto Y, Kitajima S, Hirouchi Y, Li XH, Kitamoto S, Takeshita A, Egashira K. *Antimonocyte chemoattractant protein-1 gene therapy reduces experimental in-stent restenosis in hypercholesterolemic rabbits and monkeys*. Gene Ther. 2004; 11:1273-82.
143. Tamura Y, Sugimoto M, Murayama T, Ueda Y, Kanamori H, Ono K, Ariyasu H, Akamizu T, Kita T, Yokode M, Arai H. *Inhibition of CCR2 ameliorates insulin resistance and hepatic steatosis in db/db mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2008; 28:2195-201.
144. Beltrán-Debón R, Alonso-Villaverde C, Aragonés G, Rodríguez-Medina I, Rull A, Micol V, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A, Camps J, Joven J. *The aqueous extract of Hibiscus sabdariffa calices modulates the production of monocyte chemoattractant protein-1 in humans*. Phytomedicine. 2010; 17:186-91.
145. Kanamori H, Matsubara T, Mima A, Sumi E, Nagai K, Takahashi T, Abe H, Iehara N, Fukatsu A, Okamoto H, Kita T, Doi T, Arai H. *Inhibition of MCP-1/CCR2 pathway ameliorates the development of diabetic nephropathy*. Biochem Biophys Res Commun. 2007; 360:772-7.
146. Jorge Joven. Mònica Tous. Anna Rull. *Experimentos con ratones susceptibles a arteriosclerosis. Ventajas, inconvenientes y aspectos que considerar*. Clin Invest Arterioscl. 2006; 18:155-64.
147. Anstee QM, Goldin RD. *Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research*. Int J Exp Pathol 2006; 87:1-16
148. Larter CZ, Yeh MM. *Animal models of NASH: getting both pathology and metabolic context right*. J Gastroenterol Hepatol 2008; 23:1635-1648
149. Champy MF, Selloum M, Zeitler V, Caradec C, Jung B, Rosseau S, Pouilly L, Sorg T, Auwerx J. *Genetic background determines metabolic phenotypes in the mouse*. Mann Genome 2008; 19: 318-31.
150. Joven J, Rull A, Ferré N, Escolà-Gil JC, Marsillach J, Coll B, Alonso-Villaverde C, Aragonés G, Claria J, Camps J. *The results in rodent models of atherosclerosis are not interchangeable: the influence of diet and strain*. Atherosclerosis. 2007; 195:e85-92.
151. Tous M, Ferré N, Rull A, Marsillach J, Coll B, Alonso-Villaverde C, Camps J, Joven J. *Dietary cholesterol and differential monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in aorta and liver of apo E-deficient mice*. Biochem Biophys Res Commun. 2006; 340:1078-84.
152. Steinberg D, Lewis A. *Conner Memorial Lecture. Oxidative modification of LDL and atherogenesis*. Circulation. 1997; 95:1062-71.
153. Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parhami F, Gerrity R, Schwartz CJ, Fogelman AM. *Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990;87:5134-8.

154. Weisberg SP, Hunter D, Huber R, Lemieux J, Slaymaker S, Vaddi K, Charo I, Leibel RL, Ferrante AW Jr. *CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding*. J Clin Invest. 2006 Jan;116(1):115-24.
155. Kamei N, Tobe K, Suzuki R, Ohsugi M, Watanabe T, Kubota N, Ohtsuka-Kowatari N, Kumagai K, Sakamoto K, Kobayashi M, Yamauchi T, Ueki K, Oishi Y, Nishimura S, Manabe I, Hashimoto H, Ohnishi Y, Ogata H, Tokuyama K, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Nagai R, Kadowaki T. *Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance*. J Biol Chem. 2006; 281:26602-14.
156. Lewis GF, Carpentier A, Adeli K, Giacca A. *Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes*. Endocr Rev. 2002 Apr;23(2):201-29.
157. Baldeweg SE, Golay A, Natali A, Balkau B, Del Prato S, Coppack SW. *Insulin resistance, lipid and fatty acid concentrations in 867 healthy Europeans. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR)*. Eur J Clin Invest. 2000; 30:45-52.
158. Fielding BA, Frayn KN. *Lipoprotein lipase and the disposition of dietary fatty acids*. Br J Nutr. 1998; 80:495-502.
159. Farese RV Jr, Yost TJ, Eckel RH. *Tissue-specific regulation of lipoprotein lipase activity by insulin/glucose in normal-weight humans*. Metabolism. 1991; 40:214-6.
160. Coll B, Alonso-Villaverde C, Joven J. *Monocyte chemoattractant protein-1 and atherosclerosis: is there room for an additional biomarker?* Clin Chim Acta. 2007; 383:21-9.
161. Gao B. Cytokines, STATs and liver disease. Cell Mol Immunol. 2005; 2:92-100.
162. Stienstra R, Duval C, Müller M, Kersten S. *PPARs, Obesity, and Inflammation*. PPAR Res. 2007;2007:95974.
163. Marsillach J, Camps J, Ferré N, Beltran R, Rull A, Mackness B, Mackness M, Joven J. *Paraoxonase-1 is related to inflammation, fibrosis and PPAR delta in experimental liver disease*. BMC Gastroenterol. 2009;9:3.
164. Qin X, Xie X, Fan Y, Tian J, Guan Y, Wang X, Zhu Y, Wang N. *Peroxisome proliferator-activated receptor-delta induces insulin-induced gene-1 and suppresses hepatic lipogenesis in obese diabetic mice*. Hepatology. 2008; 48:432-41.
165. Fabbrini E, Sullivan S, Klein S. *Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications*. Hepatology. 2010; 51:679-89.
166. Serkova NJ, Jackman M, Brown JL, Liu T, Hirose R, Roberts JP, Maher JJ, Niemann CU. *Metabolic profiling of livers and blood from obese Zucker rats*. J Hepatol. 2006; 44:956-62.
167. Videla LA, Rodrigo R, Araya J, Poniachik J. *Oxidative stress and depletion of hepatic long-chain polyunsaturated fatty acids may contribute to nonalcoholic fatty liver disease*. Free Radic Biol Med. 2004;37:1499-507.
168. Puri P, Baillie RA, Wiest MM, Mirshahi F, Choudhury J, Cheung O, Sargeant C, Contos MJ, Sanyal AJ. *A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease*. Hepatology. 2007;46:1081-90.
169. Zhao L, Funk CD. *Lipoxygenase pathways in atherogenesis*. Trends Cardiovasc Med. 2004;14: 191-5.
170. McClain CJ, Hill DB, Song Z, Chawla R, Watson WH, Chen T, Barve S. *S-Adenosylmethionine, cytokines, and alcoholic liver disease*. Alcohol. 2002; 27:185-92.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLAMACIÓ COM A NEXE D'UNIÓ ENTRE OBESITAT I COMPLICACIONS METABÒLIQUES: ESTEATOSI
HEPÀTICA.

Anna Rull Aixa
DL: T-1516-2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLAMACIÓ COM A NEXE D'UNIÓ ENTRE OBESITAT I COMPLICACIONS METABÒLIQUES: ESTEATOSI
HEPÀTICA.

Anna Rull Aixa
DL: T-1516-2011

VI ANNEXES

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLAMACIÓ COM A NEXE D'UNIÓ ENTRE OBESITAT I COMPLICACIONS METABÒLIQUES: ESTEATOSI
HEPÀTICA.

Anna Rull Aixa
DL: T-1516-2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLAMACIÓ COM A NEXE D'UNIÓ ENTRE OBESITAT I COMPLICACIONS METABÒLIQUES: ESTEATOSI
HEPÀTICA.

Anna Rull Aixa
DL: T-1516-2011

ANNEX 1

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLAMACIÓ COM A NEXE D'UNIÓ ENTRE OBESITAT I COMPLICACIONS METABÒLIQUES: ESTEATOSI
HEPÀTICA.

Anna Rull Aixa
DL: T-1516-2011

Review Article

Insulin Resistance, Inflammation, and Obesity: Role of Monocyte Chemoattractant Protein-1 (or CCL2) in the Regulation of Metabolism

Anna Rull,¹ Jordi Camps,¹ Carlos Alonso-Villaverde,² and Jorge Joven¹

¹ Centre de Recerca Biomèdica, Hospital Universitari Sant Joan de Reus, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili,
Universitat Rovira i Virgili, c/ Sant Joan s/n, 43201 Reus, Spain

² Servei de Medicina Interna, Hospital Son Llàtzer, 07198 Palma, Spain

Correspondence should be addressed to Jorge Joven, jjoven@grupsagessa.com

Received 21 March 2010; Accepted 13 July 2010

Academic Editor: Oreste Gualillo

Copyright © 2010 Anna Rull et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

To maintain homeostasis under diverse metabolic conditions, it is necessary to coordinate nutrient-sensing pathways with the immune response. This coordination requires a complex relationship between cells, hormones, and cytokines in which inflammatory and metabolic pathways are convergent at multiple levels. Recruitment of macrophages to metabolically compromised tissue is a primary event in which chemokines play a crucial role. However, chemokines may also transmit cell signals that generate multiple responses, most unrelated to chemotaxis, that are involved in different biological processes. We have reviewed the evidence showing that monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1 or CCL2) may have a systemic role in the regulation of metabolism that sometimes is not necessarily linked to the traffic of inflammatory cells to susceptible tissues. Main topics cover the relationship between MCP-1/CCL2, insulin resistance, inflammation, obesity, and related metabolic disturbances.

1. Introduction

Metabolic syndrome is currently one of the most serious threats to human health and chronic systemic inflammation caused by tissue malfunction or homeostatic imbalance is a characteristic feature. Maintenance of homeostasis under diverse metabolic disorders is mostly associated with obesity and requires the coordination of nutrient-sensing pathways with the immune response.

Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1 or CCL2) is a representative of the CC chemokine group, and its main known function is related to guiding monocytes to leave the circulation and become tissue macrophages, the first step in the initiation of inflammation. However, chemokines transmit cell signals that generate multiple responses, most unrelated to chemotaxis, that are involved in different biological processes. It is also frequently assumed that, in contrast to hormones, chemokines influence cellular activities in an autocrine or paracrine fashion. However, confinement to the well-defined environments of these

actions is unlikely, and chemokines may be relevant effectors in chronic systemic inflammation. Specifically, alteration of plasma CCL2 concentration in metabolic disease states, the presence of circulating chemokines reservoirs, the recent evidence of novel mechanisms of action and certain unexplained responses associated with metabolic disturbances suggest the possibility that CCL2 may play a systemic role in the regulation of metabolism.

2. Systemic Chronic Inflammation is Related to Metabolic Disturbances

The classical view of inflammation needs to be expanded to fully explain the inflammatory processes induced by adverse metabolic conditions and the accompanying deleterious effects in cells and tissues [1]. The sequence of events seems to be unaltered, and as such, the search for inducers and defining mediators remains a valid approach (Figure 1). The exact nature of the inducers that trigger the inflammatory response in tissues under metabolic stress is

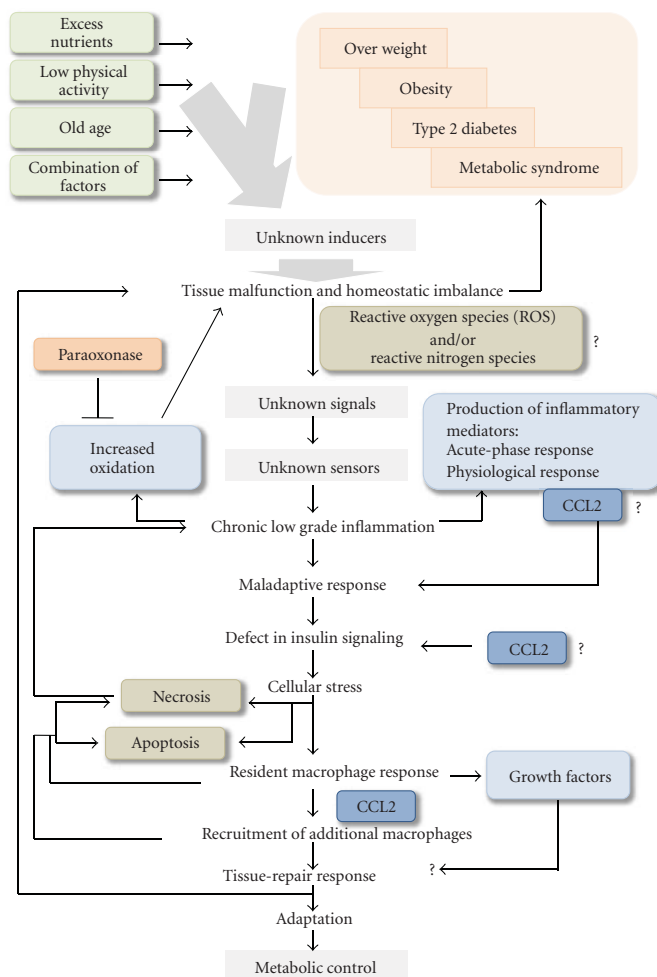


FIGURE 1: The inflammatory process and cellular metabolic control are convergent at multiple levels. Overnutrition, inactivity, old age, or a combination of factors triggers a systemic chronic inflammation associated with immune response which consists of a complex cellular adaptation in which chemokines play a crucial role.

presently unknown, but these inducers are known to differ from those associated with infection and injury. Clinical experience suggests that such inducers are tightly associated with excess nutrients, a low level of physical activity, old age, or a combination of factors leading to overweight, obesity, type II diabetes, and/or metabolic syndrome. In all of these conditions, an excess of oxidation (mainly lipid oxidation) in cells, particularly in adipose tissue, is a common finding. This leads to the activation of inflammatory cells that further increase the oxidation in a vicious cycle that must be resolved [2–11]. Therefore, to date, candidate molecules for such inducers seem to be related to the production of reactive

oxygen species (ROS) and/or reactive nitrogen species. ROS and the unstable balance between their production and the naturally occurring defenses against increased oxidation, by molecules such as paraoxonase, also have a role in converting lipoproteins into inflammatory signals by oxidizing their lipid and protein components [4, 5]. It is likely that accumulation of excess lipids may have biological effects that are signaled by unknown specific pathways. Regardless of the nature of such hypothetical inducers, they should be sufficient to trigger the production of inflammatory mediators, which in turn alter the normal functionality of many tissues and that can be classified into different groups according

to their biochemical properties. Among such mediators, inflammatory cytokines (i.e., tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-6) activate the endothelium and leukocytes and induce acute-phase responses. Particularly, chemokines (i.e., CCL2) control leukocyte extravasation and chemotaxis towards the affected tissues. However, the action of chemokines and other mediators cannot be limited to local effects; these molecules will likely display neuroendocrine and metabolic functions if we assume a more general role for inflammation in the control of tissue homeostasis [6].

Cells are normally in a basal state. A first and necessary step to induce a sequence of events is to stress these cells for which excessive availability of nutrients (a relatively modern alteration in humans) is a sufficient condition. The stress response consists of a complex, and not completely understood, cellular adaptation that is probably monitored by tissue-resident macrophages. Their basic functions include the removal of dead cells when necessary and maintenance of tissue homeostasis by a variety of tissue-specific mechanisms [7]. When cellular adaptation fails and malfunction becomes extreme, additional macrophages are recruited to help the tissues to adapt to these particular conditions of stress. The recruitment of macrophages in response to malfunctioning cells has been documented in adipocytes and hepatocytes, and increased production of CCL2 has been identified as a probable mediator [8, 9]. Obviously, if adaptation is no longer possible, the cells die. When macrophages recognize necrotic cells, a further inflammatory response will be induced, but alternatively, there may be a silent removal of dead cells if they are recognized as apoptotic. The consequence is that there is a net loss of cells; this likely needs to be compensated for by the generation of new cells of the same type. Such a process requires a subtle change in the role of macrophages and other cells to produce growth factors that promote cell proliferation in a tissue-repair response. The outcome is probably determined by additional unknown signals with intense effects on the overall metabolic control of the affected tissue and/or cells [10, 11].

3. How Does Obesity Initiate an Inflammatory Response? The Role of Macrophages, Endoplasmic Reticulum Stress, and Autophagy

There are a number of events associated with obesity that may result in the development of systemic inflammation, but how and when obesity might initiate an inflammatory response remains incompletely understood. It has been argued that large adipocytes completely consume the local oxygen supply, leading to hypoxia. This may activate cellular stress pathways, causing cell autonomous inflammation and the release of cytokines. Locally secreted chemokines attract macrophages into the adipose tissue located mainly around dead or dying adipocytes, forming characteristic crown-like structures. These macrophages release cytokines that further activate the inflammatory reaction in neighboring adipocytes, exacerbating local inflammation and expanding insulin resistance to other susceptible organs.

The underlying mechanism inside cells probably depends on c-Jun N-terminal kinase (JNK) activation in insulin-sensitive tissues, that it is probably the principal mechanism by which the inflammatory signals interfere with insulin activity [12, 13]. The endoplasmic reticulum (ER) is a principal contributor to the various ways that cells sense stress because it plays a central role in integrating multiple metabolic signals critical for cellular homeostasis (Figure 2). In particular, the increased synthetic demand for energy availability challenges ER function, and alterations in cellular ER stress increase serine phosphorylation of IRS-1 in a JNK-dependent manner; a common finding in obesity, insulin action, and type 2 diabetes [14–16]. Regardless of the signals and sensors involved in this relationship, the role of the ER-protective response, known as the unfolded protein response (UPR), may be considered additive and complementary to the response of macrophages. Under mild conditions, the upregulation of chaperone proteins may re-establish ER homeostasis. If stimuli persist or the insult is intense, cell apoptosis is unavoidable [17]. The UPR is initiated by pancreatic ER kinase (PERK), inositol-requiring kinase (IRE1), and activating transcription factor 6 (ATF6) [18], three transmembrane proteins that mediate three different stress-sensing pathways; such pathways may lead to an inflammatory response. ER stress also elicits the production of ROS [19] (with consequent oxidative damage and activation of inflammatory signals), as well as the activation of the transcription factor cyclic-AMP-responsive-element-binding protein H (CREBH), which induces the production of acute-phase proteins [20]. Mitochondrial dysfunction may add further deleterious effects.

The sequence of events leading to the link between the UPR and the inflammatory response remains to be determined. UPR signaling is extremely sensitive to nutrients and plays a central role in the maintenance of glucose homeostasis and in the regulation of energy fluctuations in cells [21]. Moreover, recent findings demonstrated a central role for lipid chaperones (fatty acid-binding proteins) in the regulation of ER homeostasis in macrophages, and the ER responses can be modified to protect the organism against the deleterious effects of hyperlipidemia [22]. The ER stress responses are also linked to the mTOR pathway, which is essential for the regulation of numerous processes, including the cell cycle, energy metabolism, the immune response, and autophagy [23]. Recent findings have identified a critical function for autophagy in lipid metabolism that could have important implications for human diseases with lipid overaccumulation [24]. Although further research is necessary to firmly establish this paradigm, the regulatory and functional similarities between autophagy and lipolysis, along with the capability of lysosomes to degrade lipids, suggest that autophagy may contribute to breakdown of both lipid droplets and triglycerides [24, 25]. Unexpectedly, the effects of a loss of autophagy on hepatocytes differ from those reported for adipose tissue. In this tissue, autophagy functions to regulate body lipid accumulation by controlling adipocyte differentiation and determining the balance between white and brown fat [25]. In the liver (or other nonadipose organs) autophagy is protective preventing

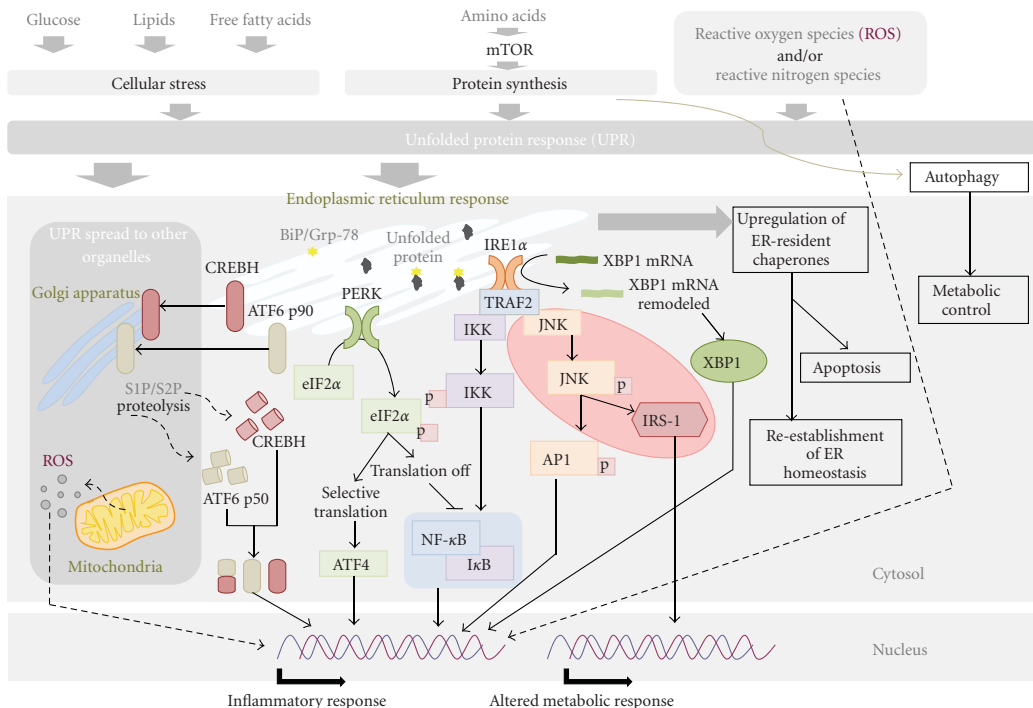


FIGURE 2: Inflammatory and metabolic responses may be interpreted as a response to cellular stress. Cells detect and react to stress in their environment. The endoplasmic reticulum is a principal contributor due to its central role in integrating multiple metabolic signals critical for cellular homeostasis.

lipotoxicity via decreased hepatic lipid accumulation and promoting safer storage in adipose tissue.

4. The Contribution of Other Immune Cells to the Complications of Obesity

Macrophages recruited to adipose tissue in subjects receiving a high-fat diet have unique inflammatory properties that are not observed in resident tissue macrophages [26]. Comparative analysis of gene expression between those recruited macrophages and the resident macrophages identified a total of 46 unique genes differentially expressed between the two populations. CCR2, which is required for recruitment of inflammatory macrophages, and genes important for macrophage activation, cellular adhesion, and migration are overexpressed in recruited macrophages. In lean mice, resident macrophages have low inflammatory activity; with obesity, newly recruited macrophages secrete pro-inflammatory cytokines. Although largely defined *in vitro*, it is generally accepted that macrophages can be classified in two different states: M1 and M2 [27, 28]. M1, or “classically activated” macrophages, are induced by proinflammatory mediators, show enhanced pro-inflammatory cytokine production, and generate ROS. At least in mice, diet-induced obesity leads

to a shift in the activation state of macrophages from an M2-polarised state in lean animals (which may protect adipocytes from inflammation) to an M1 pro-inflammatory state (which contributes to insulin resistance) [29]. This obesity-induced switch of activation state seems to be coupled to the recruitment of a characteristic inflammatory subtype cells from the circulation [30], similar to what has been previously described for atherosclerotic lesions [31]. At least two major conclusions can be drawn from the above evidence. First, an intact CCL2/CCR2 axis, the principal chemotactic pathway, is necessary for understanding the mechanistic links between adipose tissue inflammation and the effects of obesity. Second, T cells may play a significant role as the plausible source of signals to initiate T helper-1 (T_H1) responses through phagocyte activation, or humoral T_H2 responses through stimulation of B cell activity. A recent array of studies substantially clarifies this issue [32–35]. Results from Nishimura et al. [32] support the notion that CD8⁺ T cells have an essential role in the initiation and propagation of adipose tissue inflammation in obesity. It was shown in diet-induced obesity that CD8⁺ T cells infiltrate into the epididymal fat pads before macrophage infiltration. Additionally, treatment with CD8⁺-specific antibodies, resulting in CD8⁺ T cell depletion, reduced M1 macrophage

infiltration and ameliorated systemic insulin resistance in *ob/ob* mice. It can then be hypothesized that obese adipose tissue activates CD8⁺ T cells, which in turn recruit and activate macrophages. Winer et al. [33] performed a study based on the fact that some obese individuals progress to metabolic syndrome but others only have mild metabolic abnormalities [36, 37] and found that the progression of obesity-associated metabolic abnormalities is under the pathophysiological control of CD4⁺ T cells. Reconstitution of CD4⁺T cells, but not CD8⁺T cells, in lymphocyte-free obese Rag1-null mice improved glucose tolerance, enhanced insulin sensitivity, and lessened weight gain. Winer et al. [33] and Feuerer et al. [34] explored the ability of regulatory T cells (T_{reg}) in adipose tissue to provide anti-inflammatory signals that block adipose tissue inflammation. T_{reg} cells normally account for 5%–20% of the CD4⁺ compartment but are thought to be one of the body's most crucial defenses against inappropriate immune responses [38, 39]. Visceral and subcutaneous adipose tissues have similarly low fractions of T_{reg} cells at birth, with a progressive accumulation over time in the visceral, but not subcutaneous, tissue [34]. This difference may be important given the association of visceral, but not subcutaneous, fat with insulin resistance [40, 41]. Visceral fat-derived T_{reg} cells overexpress a large number of genes that are not expressed in cells from the spleen, lymph nodes, and subcutaneous adipose tissue; these genes are mostly involved in leukocyte migration (e.g., CCR2) [34]. Extremely high levels of IL-10 transcripts were found that may block the production of inflammatory mediators. When most of the T_{reg} cells were ablated, pro-inflammatory transcripts (e.g., RANTES and CCL2) were strongly induced in the fat tissue, suggesting that the anti-inflammatory properties of T_{reg} cells may have therapeutic potential to inhibit elements of the metabolic syndrome [34]. In conclusion [32–34], obesity seems to alter the balance between T_{H1} and T_{H2} stimuli in fat, probably through depletion of T_{H2} cells and adipose tissue T_{reg} cells, increase in CD8⁺ and T_{H1} cells, or a combination of both effects, leading to the infiltration of macrophages that promote inflammation. At the same time, resident macrophages may communicate with adipose tissue T_{reg} cells to maintain homeostasis (Figure 3), and other inflammatory cells may be also contributors. For instance, mast cells are increased in the adipose tissue from obese subjects as compared to that from lean donors [35]. Furthermore, in mice receiving a high-fat, high-cholesterol diet, genetically induced deficiency of mast cells or their pharmacological stabilization (via disodium cromoglycate or ketotifen) reduces body weight gain and concentrations of inflammatory cytokines and chemokines in serum and in adipose tissue [35]. The crucial role of CCL2 in the migration of immune cells remains to be determined, but it should be highlighted that recruited macrophages originate from monocytes produced in the bone marrow. These monocytes give rise to two subsets of peripheral blood monocytes. One subset (GR-1⁻, CX3CR1^{high}, CCR2⁻, and CCL6L⁻ monocytes) produces resident tissue macrophages, and the second subset (GR-1⁺, CX3CR1^{low}, CCR2⁺, and CD62L⁺ monocytes) is preferentially recruited to inflamed tissues and gives rise to macrophages and dendritic cells [42].

5. The Role of CCL2 Regulating Inflammation and Metabolic Disorders

The crucial question of what initiates the activation and infiltration of relevant cells in adipose tissue and whether this constitutes an absolute requirement remains unanswered. Hypoxia, adipocyte death, or both [43, 44] (as a response to a metabolic overload) may be responsible for the fat infiltration of inflammatory cells but secretion of chemokines, mainly CCL2, is a necessary condition.

The absence of CCL2 or CCR2 in LDLR^{-/-} and ApoE^{-/-} backgrounds protects these mice from developing atherosclerotic lesions, a condition in which macrophage recruitment and lipid overload play a crucial role. In these and other more complicated models, the CCL2/CCR2 axis may represent a common pathway for many proatherogenic factors [45–49] and plays a central role in monocyte recruitment, lesion formation, and vascular repair. However, data may vary under different experimental conditions and seem to be dependent on the metabolic status of the mice. In particular, the putative role of CCL2 appears to differ between normo- and hyperlipidemic models. The interpretation of data in these models is difficult because the expression of other chemokine genes, with redundant actions, is highly influenced by both the absence of CCL2 and the presence of dietary fat and cholesterol [50].

5.1. CCL2 Tissue Expression and Its General Impact in Metabolism. CCL2 is produced either constitutively or after selective induction (via oxidative stress, cytokines, or growth factors) by many cell types, including fibroblasts as well as endothelial, epithelial, smooth muscle, mesangial, astrocytic, monocytic, and microglial cells. It is also found in hepatocytes, adipocytes, and islet cells, and some authors consider that it is present in virtually every tissue [8, 9, 51–54] (Figure 4). Such ubiquity suggests an endocrine rather than paracrine function, as well as an important function in several biological processes. Thus, CCL2 has been implicated as a potential target in many disease states [55], including liver diseases [56] and insulin-resistant states [57]. However, it should be noted that knockout mice for CCL2 and its receptor are viable, although with minor defects, [58]; thus CCL2 may have effective surrogates. It is plausible that in the absence of CCL2, other chemokines may function effectively, but the data suggest important and pleiotropic functions. In particular, CCL2 may contribute to pathologies associated with hyperinsulinemia [57], given that *ccl2* is an insulin-responsive gene that may alter adipocyte function. Both the adipose tissue expression and circulating concentrations of CCL2 increase in obesity and decrease following treatment with thiazolidinediones [58, 59]. In a mouse model of diet-induced obesity, CCR2 deficiency attenuated the development of obesity, adipose tissue macrophage accumulation, adipose tissue inflammation, and systemic insulin resistance. Also, in mice with pre-existing obesity, short-term pharmacologic antagonism of CCR2 reduces adipose tissue macrophage content and improves *in vivo* insulin sensitivity [60]. However, the absence of CCR2 has no measurable

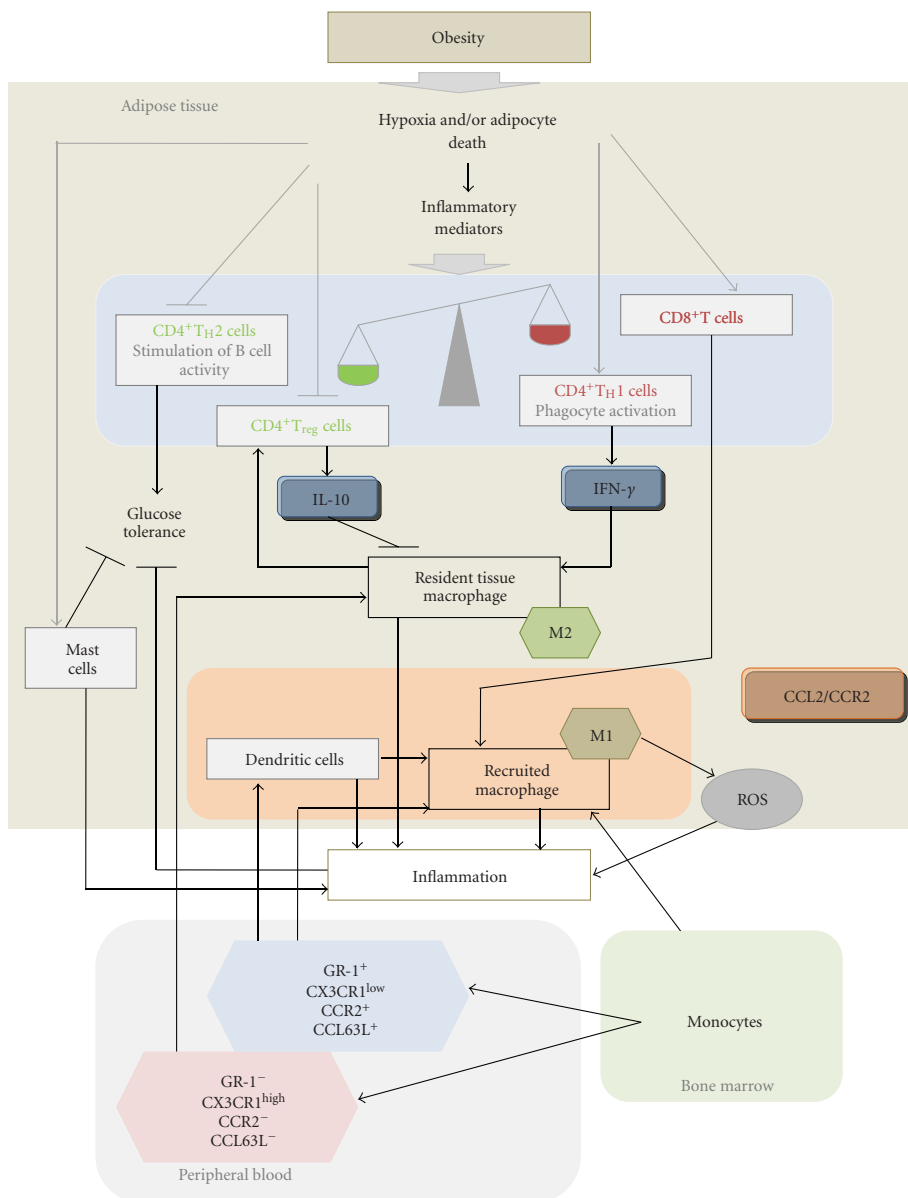


FIGURE 3: In obesity, immune cells other than macrophages may play a crucial role. To understand the heterogeneous inflammatory properties of adipose tissue macrophages, it is necessary to study the contribution of other immune cells to specific cellular response to metabolic stress.

metabolic effect in lean animals. Subsequent studies in CCL2-deficient mice suggest that CCL2 plays a minimal role in glucose metabolism and insulin sensitivity in mice fed a normal diet, but is important for pathogenic macrophage

infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis induced by a high-fat diet [61]. Moreover, studies in transgenic mice that over-express *ccl2* under the control of the adipose tissue-specific AP2 promoter indicate that CCL2

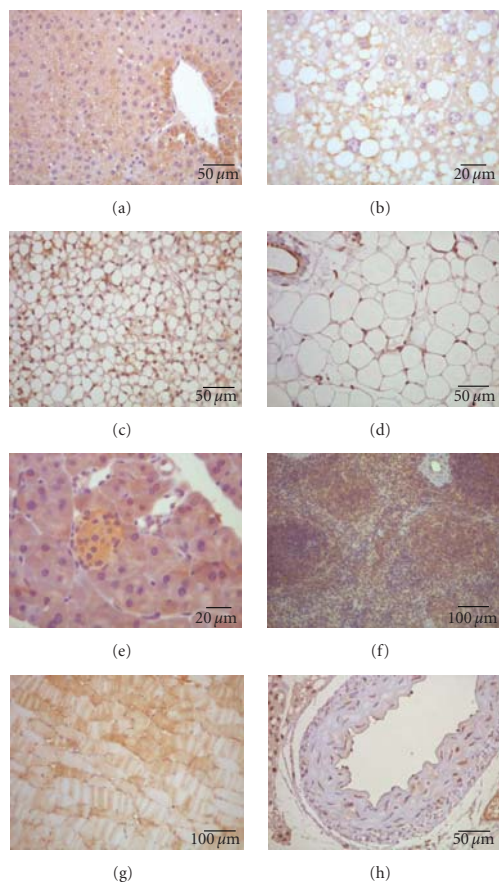


FIGURE 4: CCL2 is ubiquitously expressed and may be found in multiple cell types. It is easily detected via immunohistochemistry in tissues related to metabolism, including the liver (a), where it is also located in the periphery of lipid droplets (b), brown (c) and white (d) adipose tissues, pancreas (e), spleen (f), muscle (g) and aorta (h).

in adipose tissue, *per se*, induces macrophage recruitment and insulin resistance [62, 63].

5.2. CCL2/CCR2 Pathway and Insulin Resistance in Obesity. The CCL2/CCR2 axis is a major component of insulin resistance in obese mice. Lipid peroxidation and the consequent oxidative stress and oversecretion of CCL2 have been recently implicated in early stages of adipose tissue inflammation [64–66]. Lysophosphatidylcholine (LPC) is a prominent component of oxidized low-density lipoproteins (LDL). During oxidation, 40% of LDL phosphatidylcholine can be converted to LPC by LDL-associated phospholipase A2 [64]. LPC stimulates the production of CCL2 by cells at the transcription level through a mechanism that involves

MEK/ERK, tyrosine kinase, and (to a lesser extent) protein kinase C (PKC) activities [65]. More recent data suggest that 12/15-lipoxygenase (12/15 LO) is required for the early onset of high fat diet-induced adipose tissue inflammation and insulin resistance in mice [66]. Cells overexpressing 12/15LO secreted higher amounts of CCL2. Accordingly, adipose tissue from 12/15LO KO mice fed a high-fat diet was not infiltrated by macrophages, did not show any increase in inflammatory markers, and did not exhibit changes in the insulin-stimulated glucose disposal rate or hepatic glucose output.

5.3. CCL2 and Obesity-Associated Macrophage Recruitment Are Not Clearly Associated: Independent Effects on Metabolism. A note of caution has been recently introduced by Inouye et al. [67], who reported that the absence of CCL2 does not attenuate obesity-associated macrophage recruitment and appears to cause metabolic derangements, even in mice fed low-fat diets. Although the lack of macrophage recruitment may be masked by different experimental conditions, these results clearly indicate that CCL2 may have independent effects on metabolism that should be ascertained in future studies. Moreover, we recently described that CCL2-deficient mice, when rendered hyperlipemic by the concomitant ablation of the LDL receptor, demonstrate decreased lipoprotein clearance, derangements in free fatty acid delivery, and less glucose tolerance when fed regular chow [68]. These mice also show a partial resistance to alterations in glucose and lipid metabolism induced by dietary fat and cholesterol. LDLr^{-/-} and CCL2^{-/-}LDLr^{-/-} mice have identical apparent phenotypes and similar body weight at 11-12 weeks of age. Both strains are hyperlipemic, but the CCL2^{-/-}LDLr^{-/-} mice show higher plasma cholesterol and triglycerides, indicating a possible role for CCL2 in lipid metabolism. Further, we found similar but lower plasma cholesterol and triglyceride concentrations in CCL2^{-/-} mice as compared to wild type mice. Also, we found that CCL2^{-/-}LDLr^{-/-} mice show decreased *in vivo* [3H] VLDL catabolism as compared to LDLr^{-/-} mice. Interestingly, double KO mice also show a significant increase in plasma FFA concentration that is not observed in mice with only CCL2 deficiency. It is already documented that high plasma FFA concentration may cause peripheral insulin resistance, and that insulin resistance may also elicit decreased uptake of fatty acids by adipose tissue, promoting increased levels of circulating plasma FFAs [68] in a poorly investigated cycle. We therefore predicted a link between lipoprotein derangements and glucose metabolism that was confirmed with the observation of higher fasting plasma glucose concentration in CCL2^{-/-}LDLr^{-/-} mice than in LDLr^{-/-} mice as well as a less intense and slower response to glucose overload in the double knockout mice. Taken together, these results suggest that hyperlipidemia, which is common in obesity and metabolic syndrome, may be a confounding factor, and that the absence of CCL2 may be as metabolically deleterious as overexpression of CCL2 in certain conditions. Under these circumstances, it is therefore possible that CCL2 may act as hormone rather than as a cytokine, although it remains to be ascertained whether CCL2 and LDLr share a common metabolic pathway.

5.4. CCL2 Mediates Biological Effects Other Than Leukocyte Chemotaxis. Chemotaxis is not the only known function for CCL2 [69]. For instance, CCL2-mediated angiogenesis has been demonstrated *in vivo* and appears to be independent of its induction of leucocyte recruitment [70]. Elevated CCL2 levels induce highly elevated expression of ER stress chaperones (mainly GRP78) that may protect against cell death. This has been established in postinfarct remodeling studies in transgenic mice with cardiomyocyte-targeted expression of CCL2 [71, 72], although apparently contradictory data have been found in CCL2-deficient mice [73]. Other evidence suggests that CCL2 is also involved in the cell expression of metalloproteinases, in the recruitment of cells active in the fibrotic process, and in protection against accumulation of oxidative stress proteins [69]. Moreover, signaling initiated by CCL2 binding to CCR2 triggers the induction of a novel zinc finger protein transcription factor that can induce cell death [74]. This factor, which has been called MCP-1-induced protein (MCPIP), causes the production of reactive oxygen and nitrogen species via the induction of NADPH oxidase and inducible NO synthase [75]. This oxidative stress causes ER stress that leads to autophagy and cell death. Interestingly, the interaction between CCL2, survival, and autophagy in the complex program of tumor progression has been previously suggested [76]. Whether other processes induced by CCL2 are also mediated via MCPIP remains to be ascertained.

5.5. CCR2 Is Not the Only Receptor for CCL2: Influence of Genetic Variation in Blood Concentrations of CCL2. Although CCR2 is the known receptor for CCL2 in tissues [77], another molecule, the Duffy antigen receptor for chemokines (DARCs) mediates the interactions of CCL2, with erythrocytes and endothelial cells [78]. Because DARC lacks completely the Asp-Arg-Tyr consensus motif in its second cytoplasmic loop, it cannot couple to G proteins and subsequent signaling pathways. Consequently, it has been grouped with two other heptahelical molecules, D6 and CCX-CKR, to form a family of atypical silent chemokine receptors [79]. However, it has been recently demonstrated that DARC does not act as a decoy but instead supports chemokine activity and is required for optimal chemokine-induced leukocyte migration *in vitro* and *in vivo* [80].

Several single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the CCL2 gene have been reported to be related to blood concentrations of CCL2, but only rs1024611 (-2518 A/G) has been clinically replicated [81]. To identify the genetic basis of circulating CCL2 concentrations, a recent genome-wide association analysis has been conducted in three independent cohorts and the strongest association was for serum CCL2 with a nonsynonymous polymorphism, rs12075 (Asp42Gly) in DARC, indicating a possible role of vascular reservoir of pro-inflammatory cytokines. This association was supported by family-based genetic linkage at a locus encompassing the DARC gene underscoring the relevance of CCL2 pathophysiology for a broad spectrum of diseases [82].

5.6. CCL2 as a Therapeutic Target. A recent report has examined the effects of an increase in the plasma concentration of CCL2 resulting from short-term (acute) or long-term (chronic) administration of recombinant CCL2 in mice [83]. They found that a chronic increase in the circulating level of CCL2 induced insulin resistance, macrophage infiltration into adipose tissue, and an increase in hepatic triacylglycerol content, but an acute increase in the circulating CCL2 concentration also induced insulin resistance without macrophage infiltration into adipose tissue. In addition, the administration of a novel CCR2 antagonist ameliorated insulin resistance in mice fed a high-fat diet without affecting macrophage infiltration into adipose tissue. Taken together, their results indicate that an increase in the concentration of CCL2 in the circulation is sufficient to induce systemic insulin resistance irrespective of adipose tissue inflammation and suggest that CCL2 may be a direct effector in regulating metabolism. It is therefore conceivable that new therapeutic opportunities may arise from blocking of chemokine/receptor interactions with specific antagonists or blocking antibodies. Animal models have demonstrated effective reduction of lesion formation in coronary arteries and experimental in-stent restenosis [84, 85]. Surprisingly, such blockers have not been tested as antiobesity agents or as modulators of metabolic derangements, despite published promising results [86]. Whether such agents can be used in humans remains questionable because the effect of CCL2 suppression, as mentioned above, may not be absolutely safe. However, it may be possibly safer to transiently decrease the expression of CCL2 with plant-derived flavonoids or interfere with CCL2-CCR2 interactions using small molecules currently under investigation for safety and effectiveness [87, 88]. Current studies are also being performed to test the hypothesis that metabolic disturbances may be alleviated through the modulation of CCL2 expression.

6. Concluding Remarks and Future Perspectives

Metabolic syndrome involving obesity, insulin resistance, type 2 diabetes, liver steatosis, and cardiovascular diseases is a critically important health issue associated with over-nutrition, inactivity, old age, or a combination of factors. Growing evidence supports the presence of a systemic chronic inflammation associated with immune imbalance in all of these disorders, where chemokines play a crucial role. Chemokines act as inflammatory mediators that trigger the cell stress response in tissues and produce a general response that is not limited to local effects but instead may be associated with the generation of multiple responses. Therefore, crosstalk between cells, hormones, and chemokines is fundamental for maintaining metabolic homeostasis. Specifically, CCL2 is a multifunctional chemokine implicated as a potential target in many disease states. CCL2 was first identified by its ability to regulate monocytes, macrophages, and other inflammatory cells at sites of inflammation, but it has recently been shown to be a major component of insulin resistance in obese mice. Moreover, *ccl2* is an insulin-responsive gene that decreases insulin-stimulated glucose uptake and increases the expression of adipogenic genes.

Indeed, available data show ubiquitous expression of CCL2 that in turn may suggest an endocrine function similar to the action of hormones, which may explain its importance in several biological processes and its role in inflammation.

Future studies will need to address the possibility of new therapeutic treatments that reduce inflammatory recruitment and modulate chronic inflammatory processes but also improve metabolic disturbances through the modulation of CCL2 expression. The possibility of therapeutically and transiently modulating CCL2 with safe-plant flavonoids could offer clinical benefit.

Acknowledgment

A. Rull is the recipient of a fellowship from the Generalitat de Catalunya (FI-G 0503).

References

- [1] R. Medzhitov, "Origin and physiological roles of inflammation," *Nature*, vol. 454, no. 7203, pp. 428–435, 2008.
- [2] M. A. Hofmann, S. Drury, C. Fu et al., "RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides," *Cell*, vol. 97, no. 7, pp. 889–901, 1999.
- [3] S. F. Yan, R. Ramasamy, and A. M. Schmidt, "Mechanisms of disease: advanced glycation end-products and their receptor in inflammation and diabetes complications," *Nature Clinical Practice Endocrinology and Metabolism*, vol. 4, no. 5, pp. 285–293, 2008.
- [4] M. Navab, G. M. Anantharamaiah, S. T. Reddy, B. J. Van Lenten, B. J. Ansell, and A. M. Fogelman, "Mechanisms of disease: proatherogenic HDL—an evolving field," *Nature Clinical Practice Endocrinology and Metabolism*, vol. 2, no. 9, pp. 504–511, 2006.
- [5] J. Camps, J. Marsillach, and J. Joven, "The paraoxonases: role in human diseases and methodological difficulties in measurement," *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, vol. 46, no. 2, pp. 83–106, 2009.
- [6] A. V. Turnbull and C. L. Rivier, "Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action," *Physiological Reviews*, vol. 79, no. 1, pp. 1–71, 1999.
- [7] S. Gordon and P. R. Taylor, "Monocyte and macrophage heterogeneity," *Nature Reviews Immunology*, vol. 5, no. 12, pp. 953–964, 2005.
- [8] A. Chen, S. Mumick, C. Zhang et al., "Diet induction of monocyte chemoattractant protein-1 and its impact on obesity," *Obesity Research*, vol. 13, no. 8, pp. 1311–1320, 2005.
- [9] A. Rull, F. Rodríguez, G. Aragonès et al., "Hepatic monocyte chemoattractant protein-1 is upregulated by dietary cholesterol and contributes to liver steatosis," *Cytokine*, vol. 48, no. 3, pp. 273–279, 2009.
- [10] G. Majno and I. Joris, "Apoptosis, oncosis, and necrosis: an overview of cell death," *American Journal of Pathology*, vol. 146, no. 1, pp. 3–15, 1995.
- [11] P. M. Henson and D. A. Hume, "Apoptotic cell removal in development and tissue homeostasis," *Trends in Immunology*, vol. 27, no. 5, pp. 244–250, 2006.
- [12] G. Tuncman, J. Hirosumi, G. Solinas, L. Chang, M. Karin, and G. S. Hotamisligil, "Functional in vivo interactions between JNK1 and JNK2 isoforms in obesity and insulin resistance," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, no. 28, pp. 10741–10746, 2006.
- [13] J. Hirosumi, G. Tuncman, L. Chang et al., "A central, role for JNK in obesity and insulin resistance," *Nature*, vol. 420, no. 6913, pp. 333–336, 2002.
- [14] U. Özcan, Q. Cao, E. Yilmaz et al., "Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes," *Science*, vol. 306, no. 5695, pp. 457–461, 2004.
- [15] G. S. Hotamisligil, P. Arner, J. F. Caro, R. L. Atkinson, and B. M. Spiegelman, "Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 95, no. 5, pp. 2409–2415, 1995.
- [16] K. T. Uysal, S. M. Wiesbrock, M. W. Marino, and G. S. Hotamisligil, "Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function," *Nature*, vol. 389, no. 6651, pp. 610–614, 1997.
- [17] D. Ron and P. Walter, "Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 8, no. 7, pp. 519–529, 2007.
- [18] M. Schröder and R. J. Kaufman, "The mammalian unfolded protein response," *Annual Review of Biochemistry*, vol. 74, pp. 739–789, 2005.
- [19] N. Houstis, E. D. Rosen, and E. S. Lander, "Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance," *Nature*, vol. 440, no. 7086, pp. 944–948, 2006.
- [20] K. Zhang, X. Shen, J. Wu et al., "Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response," *Cell*, vol. 124, no. 3, pp. 587–599, 2006.
- [21] K. L. Lipson, R. Ghosh, and F. Urano, "The role of IRE1 α in the degradation of insulin mRNA in pancreatic β -cells," *PLoS ONE*, vol. 3, no. 2, Article ID e1648, 2008.
- [22] E. Erbay, V. R. Babaei, J. R. Meyers et al., "Reducing endoplasmic reticulum stress through a macrophage lipid chaperone alleviates atherosclerosis," *Nature Medicine*, vol. 15, no. 12, pp. 1383–1391, 2009.
- [23] J. H. Reiling and D. M. Sabatini, "Stress and mTOR signaling," *Oncogene*, vol. 25, no. 48, pp. 6373–6383, 2006.
- [24] R. Singh, S. Kaushik, Y. Wang et al., "Autophagy regulates lipid metabolism," *Nature*, vol. 458, no. 7242, pp. 1131–1135, 2009.
- [25] R. Singh, Y. Xiang, Y. Wang et al., "Autophagy regulates adipose mass and differentiation in mice," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 119, no. 11, pp. 3329–3339, 2009.
- [26] C. N. Lumeng, S. M. DeYoung, J. L. Bodzin, and A. R. Saltiel, "Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity," *Diabetes*, vol. 56, no. 1, pp. 16–23, 2007.
- [27] S. Gordon and P. R. Taylor, "Monocyte and macrophage heterogeneity," *Nature Reviews Immunology*, vol. 5, no. 12, pp. 953–964, 2005.
- [28] A. Mantovani, A. Sica, S. Sozzani, P. Allavena, A. Vecchi, and M. Locati, "The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization," *Trends in Immunology*, vol. 25, no. 12, pp. 677–686, 2004.
- [29] C. N. Lumeng, J. L. Bodzin, and A. R. Saltiel, "Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 117, no. 1, pp. 175–184, 2007.

- [30] C. N. Lumeng, J. B. DelProposto, D. J. Westcott, and A. R. Saltiel, "Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes," *Diabetes*, vol. 57, no. 12, pp. 3239–3246, 2008.
- [31] C.-L. Tsou, W. Peters, Y. Si et al., "Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 117, no. 4, pp. 902–909, 2007.
- [32] S. Nishimura, I. Manabe, M. Nagasaki et al., "CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity," *Nature Medicine*, vol. 15, no. 8, pp. 914–920, 2009.
- [33] S. Winer, Y. Chan, G. Paltser et al., "Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy," *Nature Medicine*, vol. 15, no. 8, pp. 921–929, 2009.
- [34] M. Feuerer, L. Herrero, D. Cipolletta et al., "Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters," *Nature Medicine*, vol. 15, no. 8, pp. 930–939, 2009.
- [35] J. Liu, A. Divoux, J. Sun et al., "Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice," *Nature Medicine*, vol. 15, no. 8, pp. 940–945, 2009.
- [36] J.-P. Després and I. Lemieux, "Abdominal obesity and metabolic syndrome," *Nature*, vol. 444, no. 7121, pp. 881–887, 2006.
- [37] R. L. Hanson, G. Imperatore, P. H. Bennett, and W. C. Knowler, "Components of the "metabolic syndrome" and incidence of type 2 diabetes," *Diabetes*, vol. 51, no. 10, pp. 3120–3127, 2002.
- [38] Y. Zheng, A. Chaudhry, A. Kas et al., "Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control TH2 responses," *Nature*, vol. 458, no. 7236, pp. 351–356, 2009.
- [39] C. A. Piccirillo, E. d'Hennezel, E. Sgouroudis, and E. Yurchenko, "CD4+Foxp3+ regulatory T cells in the control of autoimmunity: in vivo veritas," *Current Opinion in Immunology*, vol. 20, no. 6, pp. 655–662, 2008.
- [40] T. T. Tran, Y. Yamamoto, S. Gesta, and C. R. Kahn, "Beneficial effects of subcutaneous fat transplantation on metabolism," *Cell Metabolism*, vol. 7, no. 5, pp. 410–420, 2008.
- [41] O. Bosello and M. Zamboni, "Visceral obesity and metabolic syndrome," *Obesity Reviews*, vol. 1, no. 1, pp. 47–56, 2000.
- [42] F. Geissmann, S. Jung, and D. R. Littman, "Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties," *Immunity*, vol. 19, no. 1, pp. 71–82, 2003.
- [43] R. Canello, C. Henegar, N. Viguier et al., "Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss," *Diabetes*, vol. 54, no. 8, pp. 2277–2286, 2005.
- [44] M. E. Rausch, S. Weisberg, P. Vardhana, and D. V. Tortorello, "Obesity in C57BL/6J mice is characterized by adipose tissue hypoxia and cytotoxic T-cell infiltration," *International Journal of Obesity*, vol. 32, no. 3, pp. 451–463, 2008.
- [45] X. Yu, S. Druz, D. T. Graves et al., "Elevated expression of monocyte chemoattractant protein 1 by vascular smooth muscle cells in hypercholesterolemic primates," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 89, no. 15, pp. 6953–6957, 1992.
- [46] L. Gu, Y. Okada, S. K. Clinton et al., "Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice," *Molecular Cell*, vol. 2, no. 2, pp. 275–281, 1998.
- [47] T. C. Dawson, W. A. Kuziel, T. A. Osahar, and N. Maeda, "Absence of CC chemokine receptor-2 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice," *Atherosclerosis*, vol. 143, no. 1, pp. 205–211, 1999.
- [48] L. Boring, J. Gosling, M. Cleary, and I. F. Charo, "Decreased lesion formation in CCR2(-/-) mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis," *Nature*, vol. 394, no. 6696, pp. 894–897, 1998.
- [49] K. H. Han, R. K. Tangirala, S. R. Green, and O. Quehenberger, "Chemokine receptor CCR2 expression and monocyte chemoattractant protein-1-mediated chemotaxis in human monocytes: a regulatory role for plasma LDL," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 18, no. 12, pp. 1983–1991, 1998.
- [50] A. Rull, R. Beltrán-Debón, G. Aragonès et al., "Expression of cytokine genes in the aorta is altered by the deficiency in MCP-1: effect of a high-fat, high-cholesterol diet," *Cytokine*, vol. 50, no. 2, pp. 121–128, 2010.
- [51] L. Piemonti, B. E. Leone, R. Nano et al., "Human pancreatic islets produce and secrete MCP-1/CCL2: relevance in human islet transplantation," *Diabetes*, vol. 51, no. 1, pp. 55–65, 2002.
- [52] B. P. Barna, J. Pettay, G. H. Barnett, P. Zhou, K. Iwasaki, and M. L. Estes, "Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 expression in adult human non-neoplastic astrocytes is sensitive to tumor necrosis factor (TNF) or antibody to the 55-kDa TNF receptor," *Journal of Neuroimmunology*, vol. 50, no. 1, pp. 101–107, 1994.
- [53] Z. Brown, R. L. Robson, and J. Westwick, "Regulation and expression of chemokines: potential role in glomerulonephritis," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 59, no. 1, pp. 75–80, 1996.
- [54] S. D. Cushing, J. A. Berliner, A. J. Valente et al., "Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemoattractant protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 87, no. 13, pp. 5134–5138, 1990.
- [55] B. Coll, C. Alonso-Villaverde, and J. Joven, "Monocyte chemoattractant protein-1 and atherosclerosis: is there room for an additional biomarker?" *Clinica Chimica Acta*, vol. 383, no. 1-2, pp. 21–29, 2007.
- [56] J. Marsillach, N. Bertran, J. Camps et al., "The role of circulating monocyte chemoattractant protein-1 as a marker of hepatic inflammation in patients with chronic liver disease," *Clinical Biochemistry*, vol. 38, no. 12, pp. 1138–1140, 2005.
- [57] P. Sartipy and D. J. Loskutoff, "Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 12, pp. 7265–7270, 2003.
- [58] B. Lu, B. J. Rutledge, L. Gu et al., "Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 187, no. 4, pp. 601–608, 1998.
- [59] K. Takahashi, S. Mizurari, H. Araki et al., "Adiposity elevates plasma MCP-1 levels leading to the increased CD11b-positive monocytes in mice," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 47, pp. 46654–46660, 2003.
- [60] J. M. Bruun, A. S. Lihn, S. B. Pedersen, and B. Richelsen, "Monocyte chemoattractant protein-1 release is higher in visceral than subcutaneous human adipose tissue (AT): implication of macrophages resident in the AT," *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 90, no. 4, pp. 2282–2289, 2005.

- [61] H. Kanda, S. Tateya, Y. Tamori et al., "MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 116, no. 6, pp. 1494–1505, 2006.
- [62] N. Kamei, K. Tobe, R. Suzuki et al., "Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no. 36, pp. 26602–26614, 2006.
- [63] S. P. Weisberg, D. Hunter, R. Huber et al., "CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 116, no. 1, pp. 115–124, 2006.
- [64] U. P. Steinbrecher, S. Parthasarathy, D. S. Leake, J. L. Witztum, and D. Steinberg, "Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 81, no. 12, pp. 3883–3887, 1984.
- [65] J. X. Rong, J. W. Berman, M. B. Taubman, and E. A. Fisher, "Lysophosphatidylcholine stimulates monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in rat aortic smooth muscle cells," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 22, no. 10, pp. 1617–1623, 2002.
- [66] D. D. Sears, P. D. Miles, J. Chapman et al., "12/15-lipoxygenase is required for the early onset of high fat diet-induced adipose tissue inflammation and insulin resistance in mice," *PLoS ONE*, vol. 4, no. 9, Article ID e7250, 2009.
- [67] K. E. Inouye, H. Shi, J. K. Howard et al., "Absence of CC chemokine ligand 2 does not limit obesity-associated infiltration of macrophages into adipose tissue," *Diabetes*, vol. 56, no. 9, pp. 2242–2250, 2007.
- [68] A. Rull, J. C. Escolà-Gil, J. Julve et al., "Deficiency in monocyte chemoattractant protein-1 modifies lipid and glucose metabolism," *Experimental and Molecular Pathology*, vol. 83, no. 3, pp. 361–366, 2007.
- [69] J. Niu and P. E. Kolattukudy, "Role of MCP-1 in cardiovascular disease: molecular mechanisms and clinical implications," *Clinical Science*, vol. 117, no. 3, pp. 95–109, 2009.
- [70] R. Salcedo, M. L. Ponce, H. A. Young et al., "Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression," *Blood*, vol. 96, no. 1, pp. 34–40, 2000.
- [71] A. Azfer, J. Niu, L. M. Rogers, F. M. Adamski, and P. E. Kolattukudy, "Activation of endoplasmic reticulum stress response during the development of ischemic heart disease," *American Journal of Physiology*, vol. 291, no. 3, pp. H1411–H1420, 2006.
- [72] H. Morimoto, M. Takahashi, A. Izawa et al., "Cardiac overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in transgenic mice prevents cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction," *Circulation Research*, vol. 99, no. 8, pp. 891–899, 2006.
- [73] O. Dewald, P. Zymek, K. Winkelmann et al., "CCL2/monocyte chemoattractant protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts," *Circulation Research*, vol. 96, no. 8, pp. 881–889, 2005.
- [74] L. Zhou, A. Azfer, J. Niu et al., "Monocyte chemoattractant protein-1 induces a novel transcription factor that causes cardiac myocyte apoptosis and ventricular dysfunction," *Circulation Research*, vol. 98, no. 9, pp. 1177–1185, 2006.
- [75] C. W. Younce and P. E. Kolattukudy, "MCP-1 causes cardiomyoblast death via autophagy resulting from ER stress caused by oxidative stress generated by inducing a novel zinc-finger protein, MCP1P," *Biochemical Journal*, vol. 426, no. 1, pp. 43–53, 2010.
- [76] H. Roca, Z. S. Varsos, K. Mizutani, and K. J. Pienta, "CCL2, survivin and autophagy: new links with implications in human cancer," *Autophagy*, vol. 4, no. 7, pp. 969–971, 2008.
- [77] T. Kurihara and R. Bravo, "Cloning and functional expression of mCCR2, a murine receptor for the C-C chemokines JE and FIC," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 271, no. 20, pp. 11603–11606, 1996.
- [78] A. Rot, "Contribution of Duffy antigen to chemokine function," *Cytokine and Growth Factor Reviews*, vol. 16, no. 6, pp. 687–694, 2005.
- [79] A. Mantovani, R. Bonecchi, and M. Locati, "Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more," *Nature Reviews Immunology*, vol. 6, no. 12, pp. 907–918, 2006.
- [80] M. Pruenster, L. Mudde, P. Bombosi et al., "The Duffy antigen receptor for chemokines transports chemokines and supports their promigratory activity," *Nature Immunology*, vol. 10, no. 1, pp. 101–108, 2009.
- [81] J. Joven, B. Coll, M. Tous et al., "The influence of HIV infection on the correlation between plasma concentrations of monocyte chemoattractant protein-1 and carotid atherosclerosis," *Clinica Chimica Acta*, vol. 368, no. 1-2, pp. 114–119, 2006.
- [82] R. B. Schnabel, J. Baumert, M. Barbalic et al., "Duffy antigen receptor for chemokines (Darc) polymorphism regulates circulating concentrations of monocyte chemoattractant protein-1 and other inflammatory mediators," *Blood*, vol. 115, no. 26, pp. 5289–5299, 2010.
- [83] S. Tateya, Y. Tamori, T. Kawaguchi, H. Kanda, and M. Kasuga, "An increase in the circulating concentration of monocyte chemoattractant protein-1 elicits systemic insulin resistance irrespective of adipose tissue inflammation in mice," *Endocrinology*, vol. 151, no. 3, pp. 971–979, 2010.
- [84] J. Dawson, W. Miltz, A. K. Mir, and C. Wiessner, "Targeting monocyte chemoattractant protein-1 signalling in disease," *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, vol. 7, no. 1, pp. 35–48, 2003.
- [85] K. Ohtani, M. Usui, K. Nakano et al., "Antimonocyte chemoattractant protein-1 gene therapy reduces experimental in-stent restenosis in hypercholesterolemic rabbits and monkeys," *Gene Therapy*, vol. 11, no. 16, pp. 1273–1282, 2004.
- [86] Y. Tamura, M. Sugimoto, T. Murayama et al., "Inhibition of CCR2 ameliorates insulin resistance and hepatic steatosis in db/db mice," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 28, no. 12, pp. 2195–2201, 2008.
- [87] R. Beltrán-Debón, C. Alonso-Villaverde, G. Aragonès et al., "The aqueous extract of Hibiscus sabdariffa calices modulates the production of monocyte chemoattractant protein-1 in humans," *Phytomedicine*, vol. 17, pp. 186–191, 2009.
- [88] H. Kanamori, T. Matsubara, A. Mima et al., "Inhibition of MCP-1/CCR2 pathway ameliorates the development of diabetic nephropathy," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 360, no. 4, pp. 772–777, 2007.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLAMACIÓ COM A NEXE D'UNIÓ ENTRE OBESITAT I COMPLICACIONS METABÒLIQUES: ESTEATOSI
HEPÀTICA.

Anna Rull Aixa
DL: T-1516-2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLAMACIÓ COM A NEXE D'UNIÓ ENTRE OBESITAT I COMPLICACIONS METABÒLIQUES: ESTEATOSI
HEPÀTICA.

Anna Rull Aixa
DL: T-1516-2011

ANNEX 2

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLAMACIÓ COM A NEXE D'UNIÓ ENTRE OBESITAT I COMPLICACIONS METABÒLIQUES: ESTEATOSI
HEPÀTICA.

Anna Rull Aixa
DL: T-1516-2011



Contents lists available at ScienceDirect

Cytokine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/issn/10434666



Expression of cytokine genes in the aorta is altered by the deficiency in MCP-1: Effect of a high-fat, high-cholesterol diet

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

Centre de Recerca Biomèdica, Hospital Universitari Sant Joan de Reus, IISPV-Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili, c/Sant Joan s/n, 43201-Reus, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 November 2009

Received in revised form 26 January 2010

Accepted 9 February 2010

Keywords:

Atherosclerosis

Aortic gene profile

Dietary fat and cholesterol

Hyperlipemic mice

MCP-1

ABSTRACT

Background: Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) facilitates the recruitment of monocytes/macrophages into vascular intima, and it is probably involved in the regulation of other signaling pathways relevant to the pathogenesis of arteriosclerosis and metabolic disturbances. However, chemokines are redundant. Consequently, the protective effect of MCP-1 deficiency may be mediated by changes in other cytokine signals. **Methods and results:** Changes in the pattern of gene expression in the aorta were evaluated in LDLr^{-/-} and MCP-1^{-/-}LDLr^{-/-} mice fed either chow or Western-style diet. Functional analyses were used to characterize the pathways affected and to identify biological processes in which MCP-1 may play an additional role. Some data also suggest that MCP-5 may act as a surrogate for MCP-1 deletion. Arteriosclerosis lesion and plaque composition are associated with enrichment in the cytokine–cytokine receptor interaction pathway. **Conclusions:** There is a complex network of interactions linking MCP-1 and other cytokines. The lack of MCP-1 limits the aortic response to atherogenic stimuli, but does not completely protect against neointima formation. Activation of alternative inflammatory pathways in the vascular wall in response to MCP-1 deficiency should be considered to fully understand the actual role of this chemokine.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Atherosclerosis is currently considered a chronic inflammatory condition of the large and medium-sized arteries in which multiple genetic and environmental factors contribute to the diverse susceptibility to the disease [1–8]. It is difficult to elucidate the precise molecular mechanisms of disease progression in human studies, and, consequently, a considerable amount of knowledge is derived from susceptible mouse strains [9]. In particular, the pathophysiological role and the therapeutic potential of cytokines, which are capable of exerting both pro- and anti-inflammatory effects, have been recently studied in animal models [10–12].

Cytokines are involved in cell-to-cell signaling and are conventionally classified into interleukins, tumor necrosis factors (TNF), interferons (IFN), colony stimulating factors (CSF), transforming growth factors (TGF), and chemokines. Chemokines are important in the recruitment of inflammatory cells to the intima, a necessary, although not sufficient, step in the development and progression of atherosclerosis [13–15].

Experimental studies in several mouse models demonstrate that monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/Ccl2), an important CC chemokine expressed by macrophages, endothelial cells,

and smooth muscle cells [16], is involved in atherosclerosis development [17–21]. Whether MCP-1 acts just to inhibit the migration of monocytes or whether there are additional mechanisms involved remains to be established. However, it is likely that other mechanisms exist since macrophage-rich lesions are still present in the MCP-1^{-/-}LDLr^{-/-} model, and the chemokine system is a highly redundant system in which other chemokines exhibit similar functions to MCP-1 (for example MCP-2, MCP-3, and MCP-5 in mice). Moreover, the animal model in which their common receptor is absent also shows a clear but incomplete attenuation in atherosclerotic lesion [22]. It is also possible that a pleiotropic effect exists with these chemokines, as illustrated by previous findings that show expression of MCP-1 is tissue-specific [23,24], and MCP-1 or CCR2 expression is related to additional alterations in obesity and in lipid and glucose metabolism [25–27]. Our aim in this study is to determine if MCP-1 deficiency causes changes in the expression of other cytokine genes in the aorta that may be relevant to the atherosclerotic process.

2. Material and methods

2.1. Experimental animals and dietary intervention

Animals were housed under standard conditions and given a commercial mouse diet (14% Protein Rodent Maintenance diet,

* Corresponding author. Tel.: +34 977 310300; fax: +34 977 312569.

E-mail address: jjoven@grupsgassa.com (J. Joven).

Harlan, Barcelona, Spain) in accordance with our institutional guidelines. Male $LDLr^{-/-}$ mice ($n = 56$) were the progeny of mice purchased from the Jackson Laboratory, and the male double knockout mice, $MCP-1^{-/-} LDLr^{-/-}$ ($n = 56$), were the progeny of those kindly provided by the Dana Farber Cancer Institute (Rollins, BJ). All mice used in this study were in the C57BL/6J background.

The size of the experiment was planned according to previous data [8] and the animals were allocated into experimental groups by computer-generated randomization schedules. At 10 weeks of age, eight animals of each strain were sacrificed and the variables were analyzed (baseline values). The remaining littermates for each model were assigned to two dietary experimental groups.

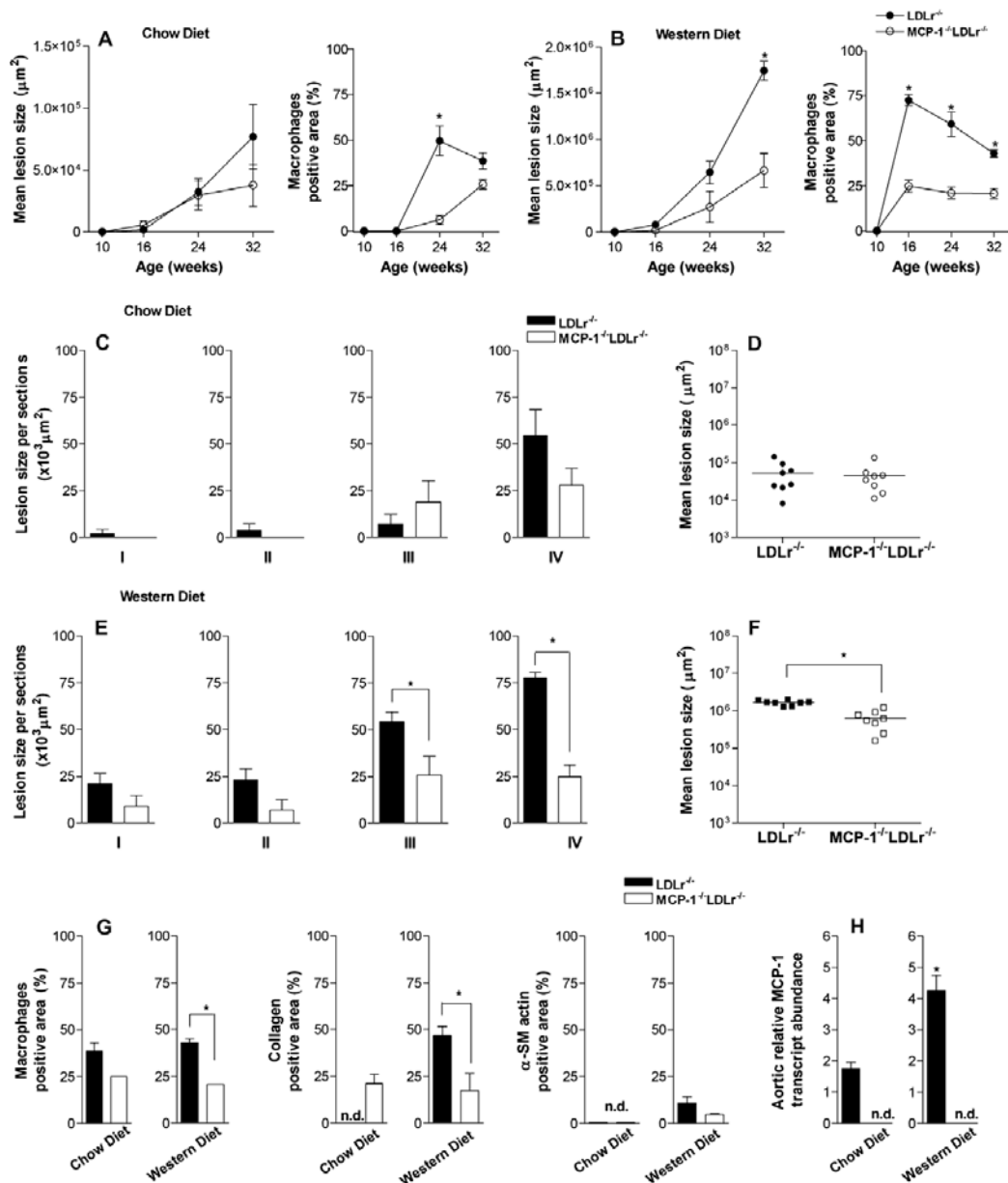


Fig. 1. Development of atherosclerotic lesion in $LDLr^{-/-}$ mice and $MCP-1^{-/-} LDLr^{-/-}$ mice fed chow and Western-style diets (A–F). $MCP-1$ deficient mice showed less atherosclerotic lesions than $LDLr^{-/-}$ mice, but the differences were only significant when mice were on the Western-style diet. The composition of the plaque (G) differed depending on whether $MCP-1$ is up-regulated or absent (H). n.d., not detectable.

One group was continued on the same maintenance diet (3% fat and 0.03% cholesterol, w/w) while the other group was put on a diet that incorporated some of the more important characteristics of the Western-style diet (20% fat and 0.25% cholesterol, w/w). Diets were prepared and labeled by an independent investigator according to the randomization schedule to assure allocation concealment. At 16 and 24 weeks of age, eight animals from each group were sacrificed to assess the course of the atherosclerotic lesion and macrophage accumulation, and at 32 weeks of age the remaining animals ($n = 8$, each group) were used for the assessment of changes in aortic gene expression. Atherosclerotic related variables were also analyzed at this time-point. No animals were excluded from analysis. Investigators responsible for the different measurements had no knowledge of the experimental group to which the animals belonged.

2.2. Assessment of atherosclerosis

Samples for the assessment of atherosclerosis were obtained at the 10, 16, 24, and 32-week time-points. Once the hearts and regions 2 mm below the ascending aorta had been removed, they were cut transversely, embedded in OCT, and immediately flash-frozen. Aortic valve leaflets were used as an anatomic reference point and a pathological evaluation was performed as described previously [28]. The proportion of macrophages (MOMA) and smooth muscle cells (actin) in the aorta were determined by immunohistochemistry using reagents from Serotec, Oxford, UK. To evaluate the collagen content in aortic lesions, Masson's trichromic staining was used. MCP-1 and MCP-5 immunoreactivity studies were performed using specific antibodies from Santa Cruz Biotechnology. Quantitative measurements were performed using the image analysis software AnaliSYS™ (Soft Imaging System, Münster, Germany).

2.3. Microarray analysis

Total RNA was isolated from thoracic and abdominal aorta as described [23]. One microgram of total RNA was reverse transcribed into cDNA using random hexamer primers and MultiScribe Reverse Transcriptase according to the manufacturer's instructions. Assays were based on a pre-selected gene primer set performed in a 96-well format (StellARrays™), which was loaded with oligonucleotide primers (including genomic and endogenous 18S controls, Supplementary Table 1). Samples and SYBR Green I master mix were added to the StellARrays™ plates and real-time PCR was performed. To avoid possible confounding results, the primer for the MCP-1/Ccl2 gene was omitted. The increased MCP-1 gene expression in LDLr^{-/-} mice and the absence of expression in the MCP-1^{-/-} LDLr^{-/-} mice were confirmed in separate experiments as described [27].

Data were analyzed using Global Pattern Recognition™ analytical software (GPR) [29], which generates a ranked list of statistically significant changes between the test groups without

reliance on the magnitude of expression. Datasets of genes with statistically significant differences in gene expression were imported to Babelomics™ (v. 3.0) [30] and linked to the gene expression profile analysis suite (GEPAS™ v. 4.0) [31] to further explore diverse analysis options for tissue/phenotype-based profiling.

2.4. Functional association analyses

A hierarchical clustering algorithm, based on the average linkage method, was used to arrange cytokine genes according to their correlation coefficients. The results were expressed as a matrix view of gene expression data (heat map) where rows represented the genes analyzed and columns represented the groups studied. The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) [32] and Gene Ontology (GO) [33] analyses were used to evaluate enrichment of the differentially expressed genes in specific pathways and their involvement in certain biological process, respectively. Calculated p values were adjusted using the Bonferroni post-hoc test. The network was analyzed using Cytoscape™ [34].

2.5. Other statistical analyses

Data were initially analyzed using ANOVA (single-factor or two-factor) and, when necessary, the U Mann–Whitney or Student's unpaired t test and Fisher's exact test with the level of significance set at $p < 0.05$. SPSS/PC+12.0 (SPSS, Chicago, IL) software was used as necessary.

3. Results

3.1. Atherosclerotic plaque formation and related variables

The age-related development of lesion size in both mouse models fed chow and Western-style diet (Fig. 1A and B) confirmed that although lesions are visible in both models, they are quantitatively smaller in MCP-1^{-/-} LDLr^{-/-} mice compared to LDLr^{-/-} mice. As expected, the accumulation of macrophages in the lesion area are more important in the LDLr^{-/-} model, although macrophage-rich lesions are still present in MCP-1^{-/-} LDLr^{-/-} mice. The differences in plaque size were significant only at the 32-week time-point and in those animals fed the Western-style diet. Consequently, further analyses will refer to this time-point.

Mean body weight was similar in both mouse models at the 32-week time-point when fed chow diet (Table 1). Both strains were hyperlipemic but MCP-1^{-/-} LDLr^{-/-} mice showed higher plasma cholesterol and triglycerides. In mice fed Western-style diet differences between both models revealed that LDLr^{-/-} mice were more sensitive to diet-induced obesity. Under this dietary condition the increase in plasma cholesterol and triglycerides was more important in LDLr^{-/-} mice. Plasma glucose concentrations remained higher in LDLr^{-/-} mice fed both chow diet and Western-style diet as compared to MCP-1^{-/-} LDLr^{-/-} mice. Detailed data on the lesion sizes measured are depicted in Fig. 1C–F. Total mean lesion size

Table 1

Changes in atherosclerotic related variables at the 32-week time-point for LDLr^{-/-} and MCP-1^{-/-} LDLr^{-/-} mice according to diet.

	Chow diet		Western-style diet	
	LDLr ^{-/-}	MCP-1 ^{-/-} LDLr ^{-/-}	LDLr ^{-/-}	MCP-1 ^{-/-} LDLr ^{-/-}
Body weight (g)	27.83 ± 0.98	26.80 ± 1.08	38.04 ± 0.87	27.53 ± 0.80*
Cholesterol (mmol/L)	7.23 ± 0.30	8.70 ± 0.27*	28.26 ± 1.09	19.03 ± 1.08*
Triglycerides (mmol/L)	1.38 ± 0.03	1.98 ± 0.20*	3.20 ± 0.20	2.93 ± 0.25
Glucose (mmol/L)	10.80 ± 0.80	8.57 ± 0.13*	18.55 ± 0.35	10.97 ± 0.50*

Data are show as mean ± SEM.

* $P < 0.05$ versus LDLr^{-/-} mice.

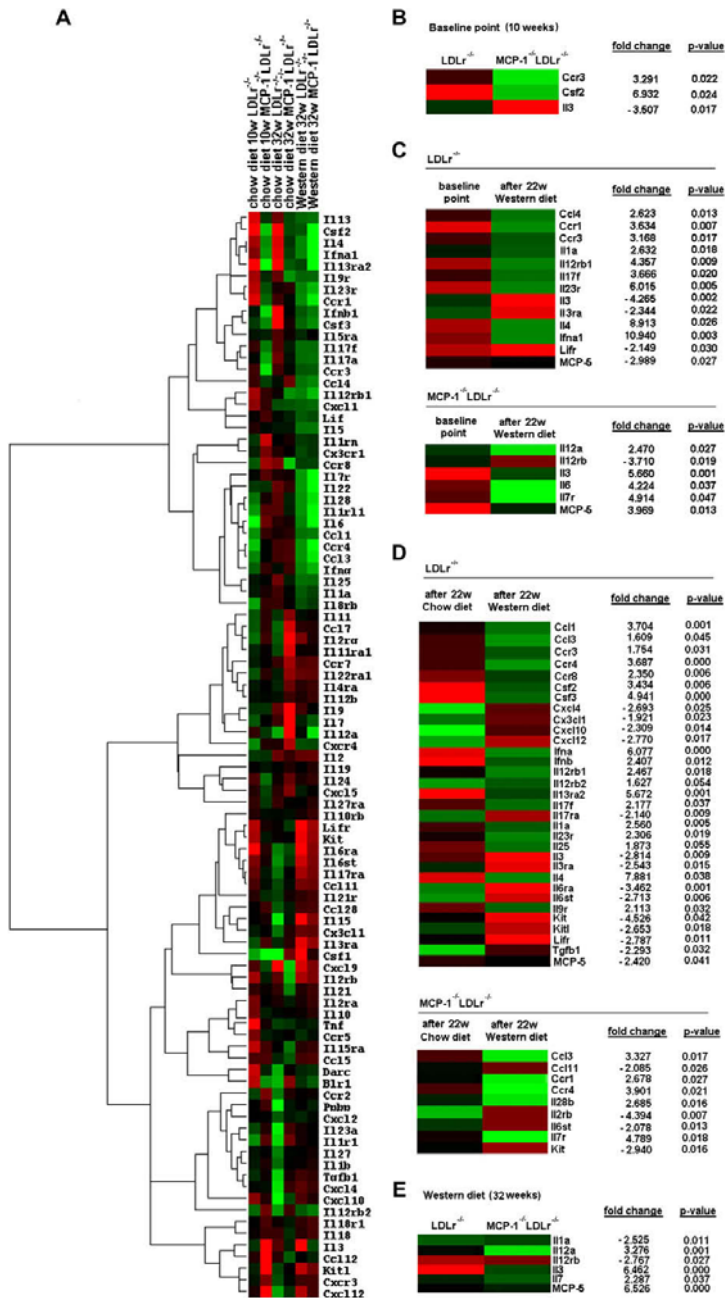


Fig. 2. General hierarchical cluster analyses of cytokine gene expression profiles (A). The red or green colors of increasing intensity indicate up-regulation or down-regulation, respectively. The dendrogram generated on the left of the cluster indicates the relatedness of the genes in the colored cluster. Further clustering analysis is shown for genes exhibiting differential expression when comparing the baseline levels in MCP-1^{-/-} LDL^{-/-} mice and LDL^{-/-} mice (B), or age- and diet-related gene changes (C), or gene changes at 32 weeks in each strain following the dietary experiment (D), or when comparing gene changes in both models fed Western-style diet (E). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

was similar in both mouse models when fed chow diet (76,823 μm^2 in LDLr^{-/-} mice compared to 43,815 μm^2 in MCP-1^{-/-} LDLr^{-/-} mice). However, the lesions were significantly ($p < 0.05$) attenuated in MCP-1^{-/-} LDLr^{-/-} mice (665,444 μm^2) compared to LDLr^{-/-} mice (1,743,514 μm^2) when they were fed a Western-style diet (Fig. 1D and F).

Analysis of the plaque composition (Fig. 1G) showed that atherosclerotic lesions found on mice fed the chow diet were mainly due to an accumulation of lipids and inflammatory cells. In mice fed the Western-style diet, plaques exhibited an increased collagen content as well as an increased number of macrophages and α -smooth muscle cells. In both models, the increase in macrophage positive cells correlated with the increase in collagen content.

3.2. Changes in the pattern of gene expression in aorta

At the 32-week time-point, we found a significantly higher rate of MCP-1 transcription in the aortas of LDLr^{-/-} mice when animals were fed the Western-style diet (Fig. 1H) compared to those fed the chow diet. The MCP-1 transcript was not detectable in the MCP-1^{-/-} LDLr^{-/-} model.

As expected from the genetic homogeneity of the animals studied, inter-individual variation in gene expression was minimal. For clarity, only mean data from each group are shown. Clustering of the rows (genes) and columns (mean data of all animals) of each studied group is shown in Fig. 2A. It is immediately apparent that diet-induced gene changes are more intense than those related to either age or genotype. At the baseline point (10 weeks of age), the differences in MCP-1^{-/-} LDLr^{-/-} mice with respect to the LDLr^{-/-} model, were only significant for the expression of Ccr3, Csf2, and Il3 (Fig. 2B). These changes are significantly associated with the cytokine–cytokine receptor interaction pathway ($p = 4.08 \times 10^{-3}$) and the cellular defense response ($p = 3.26 \times 10^{-3}$). We then assessed gene expression changes at the 32-week time-point in animals fed the chow diet. Data obtained were compared with respective expression levels at the baseline point. In this analysis, we found no significant differences in LDLr^{-/-} mice. Conversely, in MCP-1^{-/-} LDLr^{-/-} mice we found a significantly higher expression of SDF-1 (+2.732 fold change) and Il3 (+2.612 fold change). The level of significance ($p < 0.05$) was considered too low to be relevant and these changes were not associated with any specific pathway or biological process. We therefore conclude that age is not a relevant factor in explaining changes induced by MCP-1 deficiency with this particular diet. This is in accordance with the lack of significant differences in the development of atherosclerotic lesions in mice fed the chow diet. As shown in Fig. 2C, when mice were fed a Western-style diet, significant expression changes in MCP-1^{-/-} LDLr^{-/-} mice were limited to six genes. LDLr^{-/-} mice

showed differences in 13 genes. Interestingly, only Il3 and MCP-5 gene expression were significantly altered in both models; with both genes being over-expressed in MCP-1^{-/-} LDLr^{-/-} mice and under-expressed in the LDLr^{-/-} model. This suggests that in the absence of MCP-1, MCP-5 and Il3 mRNAs are preferentially translated, possibly to substitute for the function of MCP-1.

Similar results were obtained when comparing results between those fed either chow or a Western-style diet at the 32 week time-point (Fig. 2D). Numerous statistically significant differences were observed in LDLr^{-/-} mice (32 genes), which were limited in MCP-1^{-/-} LDLr^{-/-} mice to nine genes. The expression of Ccl3, Kit, Ccr4, and Il6st were similar in both mouse models. MCP-1 deficiency produced an increase in the expression of Il28b, Ccr1, and Il7r, which was not observed in LDLr^{-/-} mice. Something similar occurred with Ccl11 (Eotaxin) and Il2rb; that is, their expression was decreased in the absence of MCP-1, but their changes were not statistically significant in the LDLr^{-/-} model. Interestingly, the expression of MCP-5 and Il3 genes were decreased in the LDLr^{-/-} model, but the expected increase in MCP-1^{-/-} LDLr^{-/-} mice was not significant with this particular comparison. Finally, data obtained at the 32-week time-point in animals fed the Western-style diet was compared to detect specific gene expression changes associated with genotype and diet. The differences in MCP-1^{-/-} LDLr^{-/-} mice with respect to the LDLr^{-/-} model were significant for the expression of Il1a, Il12a, Il12rb, Il3, Il7 and MCP-5 (Fig. 2E). Again, it is notorious that Il3 and MCP-5 expression remained significantly increased in MCP-1^{-/-} LDLr^{-/-} mice. To confirm the differences observed in MCP-1 and MCP-5 expression, immunoreactivity studies were performed in animals fed either chow diet or a Western-style diet (Fig. 3). As expected, the immunoreactivity for MCP-5 was higher in the MCP-1^{-/-} LDLr^{-/-} model than in the LDLr^{-/-} model, under both dietary conditions.

The interactome networks were represented and the biological processes assessed for those comparisons with major significant expression changes (Fig. 4). In Fig. 4A, networks of gene expression changes at the 32-week time-point of animals fed on Western-style diet compared with baseline expression levels are represented for both models. The enrichment of the cytokine–cytokine receptor interaction pathway was statistically significant in both models ($p = 4.01 \times 10^{-8}$ for LDLr^{-/-} mice, and $p = 3.45 \times 10^{-4}$ for MCP-1^{-/-} LDLr^{-/-} mice). Again the absence of MCP-1 seems to be a limiting factor in establishing further connections but, interestingly, the JAK-STAT signaling pathway ($p = 3.41 \times 10^{-3}$) was also significantly enriched in the MCP-1^{-/-} LDLr^{-/-} model.

Finally, the networks based on the comparisons between the two diets at the 32-week time-point (Fig. 4B) in LDLr^{-/-} mice and in MCP-1^{-/-} LDLr^{-/-} mice showed that in the LDLr^{-/-} model, there was a statistically significant enrichment of the cytokine–

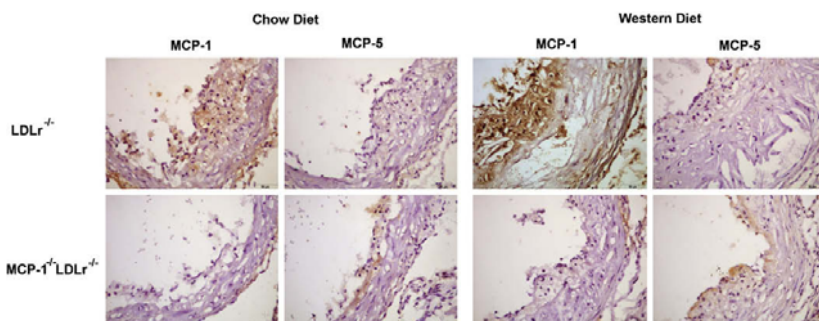


Fig. 3. Representative microphotographs from aortas of LDLr^{-/-} mice and MCP-1^{-/-} LDLr^{-/-} mice fed chow and Western-style diets. Immunochemistry studies confirmed higher MCP-5 immunoreactivity when MCP-1 gene expression is absent.

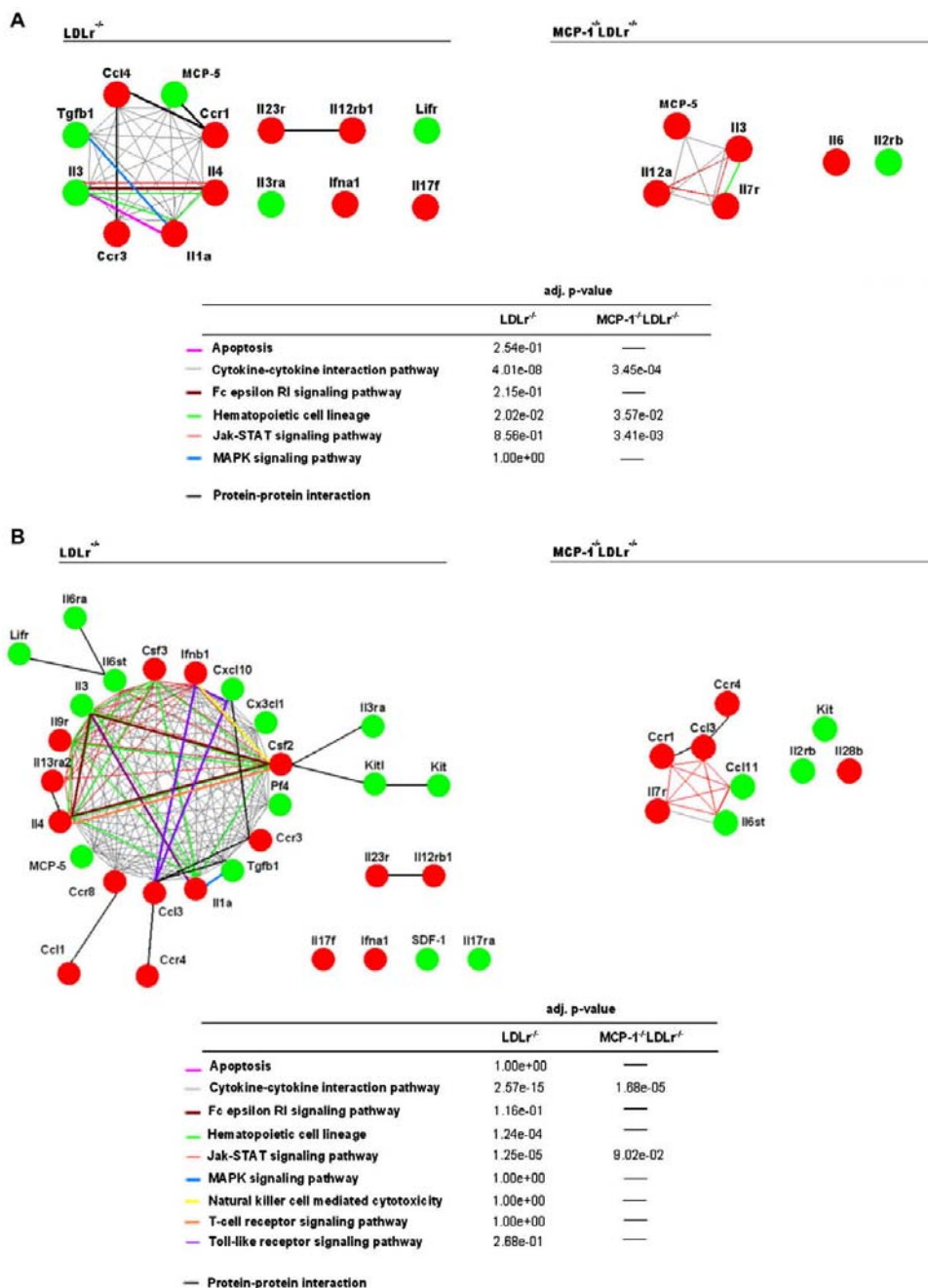


Fig. 4. Functional and direct protein interaction networks based on the genes that showed significantly different expression at the 32-week time-point on the Western-style diet compared with baseline levels (10 weeks) (A) and genes that were significantly different between both diets at the 32-week time-point (B). The interactions are color-coded according to the legend depending on the pathway or interaction involved. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

cytokine receptor interaction ($p = 2.57 \times 10^{-15}$), hematopoietic cell lineage ($p = 1.24 \times 10^{-4}$), and the JAK-STAT signaling pathway ($p = 1.25 \times 10^{-5}$). However, in MCP-1^{-/-} LDLr^{-/-} mice, only the cytokine–cytokine receptor interaction pathway ($p = 1.68 \times 10^{-5}$) was significantly associated with gene expression changes. The most prominent biological processes were related to chemotaxis and the cellular and inflammatory responses, but phosphorylation processes were also identified as significantly altered in LDLr^{-/-} mice.

4. Discussion

Previous studies have established a fundamental role for MCP-1/Ccl2 in atherosclerosis [17–21]. It has been argued that this may be simply due to a deficit in monocyte migration into the intima but our data suggest that this approach is unlikely and that the actual mechanism is probably multifactorial. The course of plaque formation in our mice confirms the protective effect of MCP-1 deficiency. Although the reduced atherosclerotic lesions size in the MCP-1^{-/-} LDLr^{-/-} model is evident in mice fed a chow diet and significantly reduced in mice on a Western-style diet at the 32-week time-point, MCP-1 deficiency does not completely protect against neointima formation. Consequently, and considering that chemokines represent a redundant system, we have extended our study to investigate if MCP-1 deficiency can cause changes in other cytokine genes in the aorta whose expression may compensate for MCP-1 as an inducer of monocyte migration. Our data suggest that MCP-1 may play a fundamental role in modulating the response to atherogenic stimuli in the pattern of cytokine gene expression in the aorta. Such responses were completely different in animals fed chow versus the Western-style diet, but in both cases, MCP-1 deficiency substantially limited the aortic response.

Several changes in aortic cytokine gene expression were already observed at the baseline point, before the dietary experiment began and before there was any appreciable lesion development. Surprisingly, up-regulation of Ccr3 and colony stimulating factor-2 (Csf2) in MCP-1 deficient animals apparently represents an activation of nuclear factor kappa B signaling pathways. Our data suggest that such activation should be interpreted as a pathway of vascular inflammation, but it is documented that expression of anti-apoptotic and anti-inflammatory pathways cannot be discarded [35]. Moreover, Ccr3 is the major receptor for eotaxin, Ccl5 (RANTES), and MCP-2 [36]. In addition, down-regulation of Il3 may represent an increased activation of Ccr3 expression [37]. Since the available data is scarce and inconclusive, these changes cannot be identified as protective although it does confirm our hypothesis that MCP-1 deficiency alters aortic gene expression.

Age-related changes also confirm the modulator effect produced by MCP-1 deficiency. We report statistically significant over-expression of SDF-1/Cxcl12 and Il3 in MCP-1^{-/-} LDLr^{-/-} mice, which is not observed in the LDLr^{-/-} model. Again, it is difficult to discuss these findings with regard to our current data, but previous studies suggest that these changes are pro-atherogenic [38], especially if combined with multiple inflammatory stimuli [39].

Changes in the pattern of cytokine gene expression are ostensibly stronger when mice were fed a Western-style diet compared to a chow diet. Dietary effects are also more evident in LDLr^{-/-} mice than in MCP-1^{-/-} LDLr^{-/-} mice, indicating that MCP-1 may be responsible for most of the gene expression changes in this model and consequently may be related to plaque formation and composition. It is notable that the expression patterns of MCP-5 and Il3 differed between the two models, being statistically down-regulated in the LDLr^{-/-} model and up-regulated in MCP-1^{-/-} LDLr^{-/-} mice. This inverse relationship clearly suggests a role for MCP-1 in regulating MCP-5 and Il3 expression. In LDLr^{-/-} mice, which

show an increased expression of MCP-1, MCP-5 is down-regulated, but in the absence of MCP-1, MCP-5 is up-regulated. All monocyte chemoattractant proteins exert their actions via activation of Ccr2. To date, there is a paucity of data on the possible role of other MCPs in the development of the atherosclerotic lesion [40,41], but it has been documented that MCP-5 is highly homologous to MCP-1 [42] and that MCP-3 shares some key biological features with MCP-1. The expression of MCP-3 parallels to that of MCP-1 in monocyte recruitment and host defense [43]. In our analysis, MCP-3 did not change significantly in any of the models tested. These findings, further confirmed in immunochemistry studies, suggest that MCP-5 may act as a surrogate for MCP-1 when this chemokine is absent. As shown by the interactome networks identified, the effects of diet on the differential expression of cytokine genes is evident. Dietary fat and cholesterol profoundly change the cytokine–cytokine receptor interaction in the arterial wall. This effect is clearly limited by MCP-1 deficiency, at least quantitatively. In order to clarify this intricate response, further research efforts will be required. Particularly, we have explored a model of increased MCP-1 response in comparison with absolute deficiency that is extremely unlikely. An additional approach should be a similar assessment in mice with a limited MCP-1 response. Further, we have recently reported that the MCP-1 response may be decreased via the chronic administration of xenohormetic compounds [44]. To test their efficacy in preventing the development of atherosclerotic lesions may also blaze new trails in preventing efforts.

In conclusion, MCP-1 deficiency apparently activates other inflammatory pathways in the vascular wall which may explain similar lesion development in MCP-1^{-/-} LDLr^{-/-} mice and LDLr^{-/-} mice fed a chow diet. However, the absence of MCP-1 severely disrupts the arterial wall response in the development of arteriosclerosis when mice are fed a high-fat, high-cholesterol diet. Additionally, our data suggest that MCP-5 may act as a surrogate for MCP-1.

Acknowledgments

We are grateful to Pilar Hernández for valuable bioinformatics and statistical assistance. This work was supported by grants PI051606 and PI081381 from the Fondo de Investigación Sanitaria (FIS). Anna Rull is the recipient of a fellowship from the Generalitat de Catalunya (FI-G 0503).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.cyto.2010.02.010.

References

- [1] Ounpuu S, Anand S, Yusuf S. The impending global epidemic of cardiovascular diseases. *Eur Heart J* 2000;21:880–3.
- [2] Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115–26.
- [3] Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. The road ahead. *Cell* 2001;104:503–16.
- [4] Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;352:1685–95.
- [5] Doevendans PA, Jukema W, Spiering W, Defesche JC, Kastelein JJ. Molecular genetics and gene expression in atherosclerosis. *Int J Cardiol* 2001;80:161–72.
- [6] Andreassi MG. Metabolic syndrome, diabetes and atherosclerosis: influence of gene–environment interaction. *Mutat Res* 2009;667:35–43.
- [7] Roy H, Bhardwaj S, Yla-Herttuala S. Molecular genetics of atherosclerosis. *Hum Genet* 2009;125:467–91.
- [8] Joven J, Rull A, Ferré N, Escola-Gil JC, Marsillach J, Coll B, et al. The results in rodent models of atherosclerosis are not interchangeable: the influence of diet and strain. *Atherosclerosis* 2007;195:e85–92.
- [9] Daugherty A, Rateri DL. Development of experimental designs for atherosclerosis studies in mice. *Methods* 2005;36:129–38.
- [10] Kleemann R, Zadelaar S, Koobstra T. Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. *Cardiovasc Res* 2008;79:360–76.

- [11] Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev* 2006;86:515–81.
- [12] Cohen S. Cytokine: more than a new word, a new concept proposed by Stanley Cohen thirty years ago. *Cytokine* 2004;28:242–7.
- [13] Gerard C, Rollins BJ. Chemokines and disease. *Nat Immunol* 2001;2:108–15.
- [14] Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 2006;354:610–21.
- [15] Zernecke A, Shagdarsuren E, Weber C. Chemokines in atherosclerosis: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:1897–908.
- [16] Gu L, Tseng SC, Rollins BJ. Monocyte chemoattractant protein-1. *Chem Immunol* 1999;72:7–29.
- [17] Aiello RJ, Bourassa PA, Lindsey S, Weng W, Natoli E, Rollins BJ, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1518–25.
- [18] van Royen N, Hoefler I, Buschmann T, Kostin S, Voskuil M, Bode C, et al. Effects of local MCP-1 protein therapy on the development of the collateral circulation and atherosclerosis in Watanabe hyperlipidemic rabbits. *Cardiovasc Res* 2003;57:178–85.
- [19] Ni W, Kitamoto S, Ishibashi M, Usui M, Inoue S, Hiasa K, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 is an essential inflammatory mediator in angiotensin II-induced progression of established atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:534–9.
- [20] Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, et al. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell* 1998;2:275–81.
- [21] Gosling J, Slaymaker S, Gu L, Tseng S, Zlot CH, Young SG, et al. MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. *J Clin Invest* 1999;103:773–8.
- [22] Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 1998;394:894–7.
- [23] Tous M, Ferré N, Rull A, Marsillach J, Coll B, Alonso-Villaverde C, et al. Dietary cholesterol and differential monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in aorta and liver of apo E-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;340:1078–84.
- [24] Rull A, Rodríguez F, Aragónès G, Marsillach J, Beltrán R, Alonso-Villaverde C, et al. Hepatic monocyte chemoattractant protein-1 is upregulated by dietary cholesterol and contributes to liver steatosis. *Cytokine* 2009;48:273–9.
- [25] 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;116:1494–505.
- [26] Weisberg SP, Hunter D, Huber R, Lemieux J, Slaymaker S, Vaddi K, et al. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest* 2006;116:115–24.
- [27] Rull A, Escola-Gil JC, Julve J, Rotllan N, Calpe-Berdiel L, Coll B, et al. Deficiency in monocyte chemoattractant protein-1 modifies lipid and glucose metabolism. *Exp Mol Pathol* 2007;83:361–6.
- [28] Calleja L, Paris MA, Paul A, Vilella E, Joven J, Jimenez A, et al. Low-cholesterol and high-fat diets reduce atherosclerotic lesion development in ApoE-knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2368–75.
- [29] Akilesh S, Shaffer DJ, Roopenian D. Customized molecular phenotyping by quantitative gene expression and pattern recognition analysis. *Genome Res* 2003;13:1719–27.
- [30] Al-Shahrour F, Minguez P, Vaquerizas JM, Conde L, Dopazo J. BABELOMICS: a suite of web tools for functional annotation and analysis of groups of genes in high-throughput experiments. *Nucleic Acids Res* 2005;33:W460–4.
- [31] Herrero J, Al-Shahrour F, Díaz-Uriarte R, Mateos A, Vaquerizas JM, Santoyo J, et al. GEPAS: a web-based resource for microarray gene expression data analysis. *Nucleic Acids Res* 2003;31:3461–7.
- [32] Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* 2000;28:27–30.
- [33] Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The gene ontology consortium. *Nat Genet* 2000;25:25–9.
- [34] Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction network. *Genome Res* 2003;13:2498–504.
- [35] Haley KJ, Lilly CM, Yang JH, Feng Y, Kennedy SP, Turi TG, et al. Overexpression of eotaxin and the CCR3 receptor in human atherosclerosis: using genomic technology to identify a potential novel pathway of vascular inflammation. *Circulation* 2000;102:2185–9.
- [36] Steppich BA, Moog P, Matissek C, Wisniewski N, Kühle J, Joghetaei N, et al. Cytokine profiles and T cell function in acute coronary syndromes. *Atherosclerosis* 2007;190:443–51.
- [37] Dulkys Y, Kluthe C, Buschermöhle T, Barg I, Knoss S, Kapp A, et al. IL-3 induces down-regulation of CCR3 protein and mRNA in human eosinophils. *J Immunol* 2001;167:3443–53.
- [38] Schober A, Knarren S, Lietz M, Lin EA, Weber C. Crucial role of stromal cell-derived factor-1 α in neointima formation after vascular injury in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2003;108:2491–7.
- [39] Coll B, Parra S, Alonso-Villaverde C, Aragónès G, Montero M, Camps J, et al. The role of immunity and inflammation in the progression of atherosclerosis in patients with HIV infection. *Stroke* 2007;38:2477–84.
- [40] Jang MK, Kim JY, Jeoung NH, Kang MA, Choi MS, Oh GT, et al. Oxidized low-density lipoproteins may induce expression of monocyte chemoattractant protein-3 in atherosclerotic plaques. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;323:898–905.
- [41] Wang X, Li X, Yue TL, Ohlstein EH. Expression of monocyte chemoattractant protein-3 mRNA in rat vascular smooth muscle cells and in carotid artery after balloon angioplasty. *Biochim Biophys Acta* 2000;1500:41–8.
- [42] Sarafi MN, Garcia-Zepeda EA, MacLean JA, Charo IF, Luster AD. Murine monocyte chemoattractant protein (MCP)-5: a novel CC chemokine that is a structural and functional homologue of human MCP-1. *J Exp Med* 1997;185:99–109.
- [43] Jia T, Serbina NV, Brandl K, Zhong MX, Leiner IM, Charo IF, et al. Additive roles for MCP-1 and MCP-3 in CCR2-mediated recruitment of inflammatory monocytes during *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* 2008;180:6846–53.
- [44] Beltrán-Debón R, Alonso-Villaverde C, Aragónès G, Rodríguez-Medina I, Rull A, Micó V, et al. The aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* calices modulates the production of monocyte chemoattractant protein-1 in humans. *Phytomedicine* 2010;17:186–91.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLAMACIÓ COM A NEXE D'UNIÓ ENTRE OBESITAT I COMPLICACIONS METABÒLIQUES: ESTEATOSI
HEPÀTICA.

Anna Rull Aixa
DL: T-1516-2011

ANNEX 3

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLAMACIÓ COM A NEXE D'UNIÓ ENTRE OBESITAT I COMPLICACIONS METABÒLIQUES: ESTEATOSI
HEPÀTICA.

Anna Rull Aixa
DL: T-1516-2011



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimie

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochi



Short communication

Metabolic phenotyping of genetically modified mice: An NMR metabonomic approach[☆]

Anna Rull^a, Maria Vinaixa^b, Miguel Ángel Rodríguez^b, Raúl Beltrán^a, Jesús Brezmes^b,
Nicolau Cañellas^b, Xavier Correig^b, Jorge Joven^{a,*}

^aCentre de Recerca Biomèdica, Hospital Universitari Sant Joan de Reus, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, c/ Sant Joan s/n, 43201 Reus, Spain

^bMetabolomics Platform, Universitat Rovira i Virgili, Avda. Països Catalans 26, 43007 Tarragona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 December 2008

Accepted 27 April 2009

Available online 9 May 2009

Keywords:

CYP7A1

¹H NMR spectroscopy

MCP-1

Metabonomics

Taurine

ABSTRACT

Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) plays a relevant role in macrophage migration but recent findings suggest an additional role in lipid and glucose metabolism. We report the use of ¹H NMR spectroscopy as a useful complementary method to assess the metabolic function of this gene in a comparative strategy. This metabonomic analysis was rapid, simple, quantitative and reproducible, and revealed a suggestive relationship between the expression of the MCP-1 gene and hepatic glucose and taurine concentrations. This approach should be considered in genetically modified mice when a metabolic alteration is suspected, or in routine assessment of metabolic phenotype.

© 2009 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

The evaluation of the activity of candidate genes or proteins through transcriptomics and proteomics is usually expensive and complex. With the rationale that small differences in metabolism may result in pronounced changes in metabolite concentrations, we designed a metabonomic approach to assess the function of selected genes in genetically modified mice using a comparative strategy between knockout and derived double-knockout mice. To test this approach we chose MCP-1. Although the main role reported for MCP-1 is related to monocyte trafficking and other immunological functions [1,2], there is evidence to suggest that it participates in metabolism [3]. We have demonstrated that MCP-1 is involved in the development of obesity and in impaired glucose metabolism in LDLR-deficient mice (LDLR^{-/-}) fed a high-fat and high-cholesterol diet [4]. Since altered glucose metabolism is a prominent factor in the development of liver steatosis, a notorious characteristic of these animals [5], we have explored the possible role of MCP-1 using liver as an experimental tissue.

We reasoned that high resolution ¹H NMR spectroscopy might provide an adequate evaluation of the low molecular weight compounds present in the hepatic tissue of animals and, therefore, may

constitute a useful complementary tool to the classical phenotyping protocols currently used in the metabolic exploration of the mouse.

2. Material and methods

2.1. Animals and diets

We conducted all experiments in male (C57BL/6j) LDLR^{-/-} mice (Jackson Laboratories), and the derived double-knockout male mice that were also deficient in MCP-1 (MCP1^{-/-}LDLR^{-/-}). All procedures were carried out in accordance with the ethical committee of the Universitat Rovira i Virgili. Groups of 10-week-old mice ($n = 5$ for each group) of both strains were used to assess reproducibility and inter-assay variation, in all the studies performed. To explore the effects of diet, ten animals of each strain were assigned to two dietary groups ($n = 5$ each), regular chow (diet 1) and chow diet supplemented with palm oil (20% fat w/w) and 0.25% (w/w) cholesterol (diet 2). The dietary experiment lasted for 22 weeks, after which five animals of both groups were fasted for 13 h and euthanised as described [4]. Blood samples were obtained and liver tissues were removed, flash-frozen and stored at -80°C until further analysis or fixed for 24 h in 10% neutral-buffered formalin for histology.

2.2. Biochemistry and histological analysis

Plasma glucose concentration was determined by standard laboratory procedures and liver histological examination was

[☆] This work was supported by grants (05/1606) from the Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) and the CIBERDEM. Anna Rull is a recipient of a fellowship from the Generalitat de Catalunya (FI-G 0503).

* Corresponding author. Tel.: +34 977 310300x5409; fax: +34 977 312569.

E-mail address: jjoven@grupsgassa.com (J. Joven).

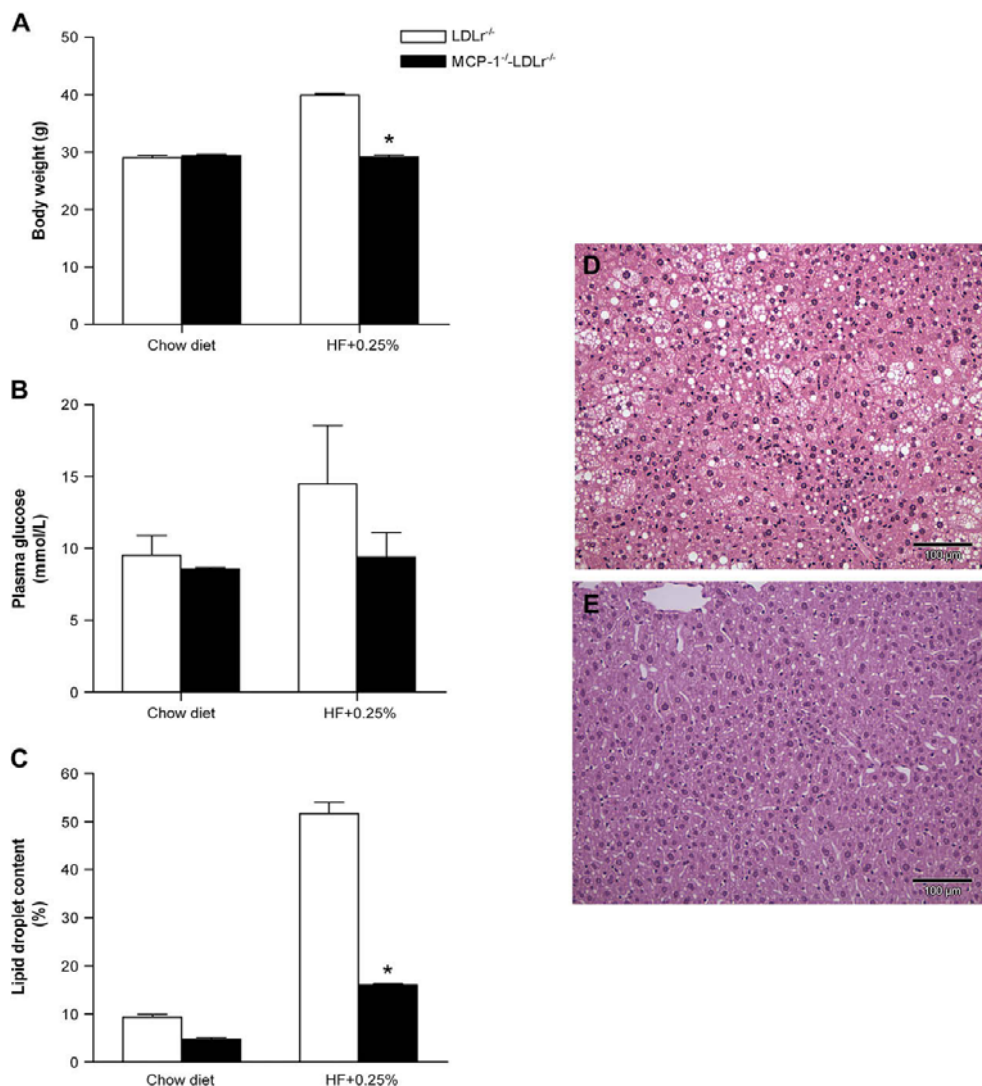


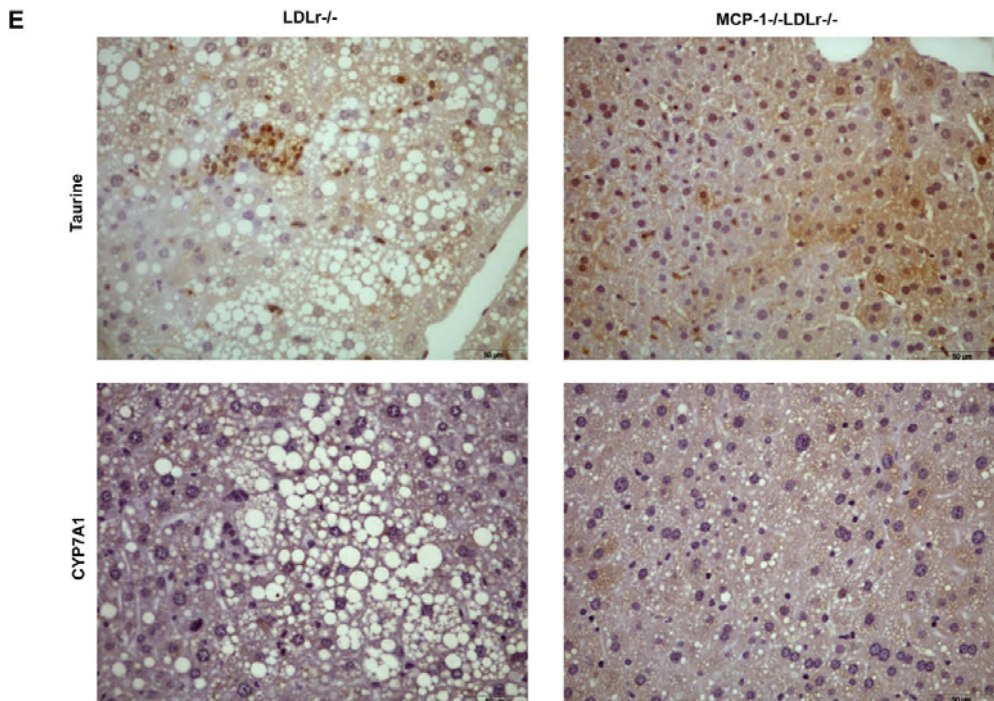
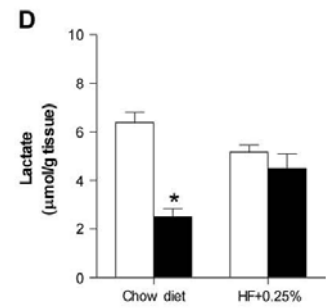
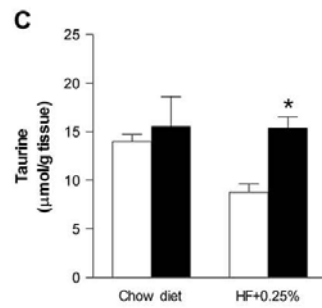
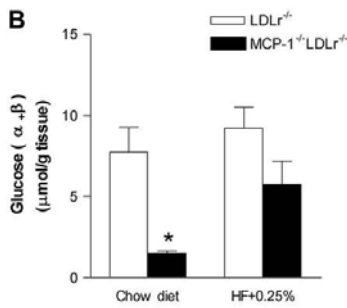
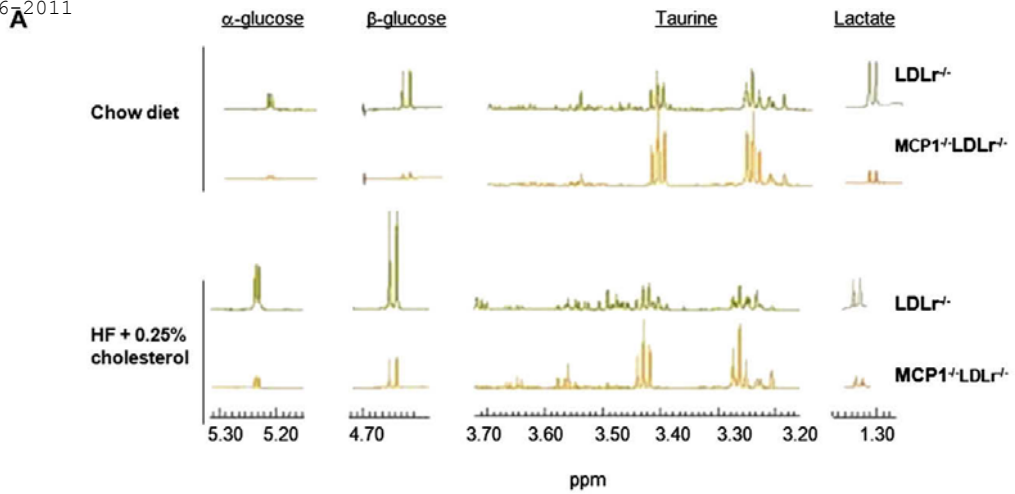
Fig. 1. Biochemical and histological variations observed in the studied mice. At the end of the experiment there was a significant increase in the body weight (A) and plasma glucose concentration (B) in LDLr^{-/-} mice fed with high fat, high cholesterol diet (HF+0.25% cholesterol) as compared with MCP1^{-/-}LDLr^{-/-} mice, suggesting that MCP-1 may have a significant metabolic function. At 32 weeks of age, liver steatosis was consistently more evident in LDLr^{-/-} mice (C, D) fed with a high fat, high cholesterol diet than in MCP1^{-/-}LDLr^{-/-} mice (E). **p* < 0.05 with respect to LDLr^{-/-} mice.

performed to measure the lipid droplet content (percentage of lipid droplet area/cell) using the AnaliSYS system (Soft Imaging System, Münster, Germany). For histological evaluation, paraffin-embedded sections were stained with haematoxylin and eosin (H&E). The amount of taurine-stained cells and the hepatic CYP7A1 content were revealed using specific antibodies from Abcam (Cambridge, UK) and Santa Cruz Biotechnology (CA, USA), respectively.

2.3. NMR methodology

For NMR spectroscopy, a portion of hepatic tissue (50 mg) was mechanically homogenised using the Precellys[®]24 instrument in 1 ml of 1:1H₂O/CH₃CN. The homogenates were centrifuged at 5000 × *g* for 15 min at 4 °C and the supernatant was removed and lyophilised until analysis. The extracts were reconstituted in 150 μl

Fig. 2. Metabonomic analysis of liver aqueous extracts from LDLr^{-/-} and MCP1^{-/-}LDLr^{-/-} mice (A). Significant differences between both strains are shown in 1D representative spectra at 3.26 and 3.42 ppm (taurine), 1.34 ppm (lactate) and at 3.5–4 ppm (glucose and glycogen). MCP1^{-/-}LDLr^{-/-} mice showed higher concentrations of taurine (C) and lower concentrations of glucose (B) and lactate (D) than LDLr^{-/-} mice. In MCP1^{-/-}LDLr^{-/-} mice, most liver cells showed taurine immunoreactivity, whereas in the LDLr^{-/-} model taurine content was especially located in macrophage/Kupffer cells. The expression of CYP7A1 was also higher in the double-knockout model (E). **p* < 0.05 with respect to LDLr^{-/-} mice.



of D₂O (0.1% 3-trimethylsilylpropionic-(2,2,3,3-d₄)-acid (TSP)), centrifuged at 13,000 × g for 10 min and the supernatant was removed for analysis with a 5 mm triple-resonance cryoprobe.

¹H NMR spectra were acquired at 600.13 MHz on an Avance III-600 spectrometer (Bruker, Rheinstetten, Germany). One-dimensional pulse experiments were carried out using a water presaturation pulse sequence (RD-90°-t₁-90°-t_m-90° acquired FID) to suppress the water peak. A secondary irradiation field was achieved during the relaxation delay and during the mixing time t_m (100 ms), with t₁ fixed at 4 μs. For each sample, 128 transients were collected. The acquired NMR spectra were phased, baseline-corrected and calibrated by setting the tetramethylsilane peak at 0.0 ppm using TopSpin software (version 2.0, Bruker). For metabolite identification, both heteronuclear single quantum correlation (HSQC) and correlation spectroscopy (COSY) were used. For COSY spectra, 400 increments of 4K data points were collected with 8 transients per increment and a ¹H spectral width of 9600 Hz. For HSQC spectra, 256 increments of 2 K data points were acquired with 32 transients per increment and the data were zero-filled by a factor before Fourier transformation.

The ¹H NMR spectra were data-reduced using the AMIX 3.7 software package (Bruker) and referenced to TSP. The spectral region was divided from 0.1 to 10 ppm into regions of 0.04 ppm width and the regions of the spectrum containing residual water (4.76–4.80 ppm) were excluded. All remaining spectral segments were scaled and mean-centred prior to principal component analysis (PCA). The PCA method reduced the spectral variance to a number of principal components and was used to represent spectra as points in multidimensional PC space. The corresponding loading plots were used to visually identify which spectral variables contributed to the differences observed between the studied groups.

3. Results

3.1. General evaluation of metabolic changes

Once the measurement parameters were decided, the experiments showed good repeatability and reproducibility with inter-assay coefficients of variation lower than 3%. The effects of dietary intervention on mice with the different genotypes are summarised in Fig. 1. Mean body weight was similar in both strains on chow diet as well as plasma glucose and the hepatic lipid droplet content. However, a cholesterol-rich diet elicited significant increases in body weight ($p < 0.001$) and hepatic steatosis ($p < 0.001$) (Fig. 1A, C), that were histologically severe in LDLr^{-/-} mice (Fig. 1D) and completely prevented or alleviated when MCP-1 was absent (Fig. 1E). A similar effect was observed with respect to plasma glucose (Fig. 1B), but it did not reach statistical significance.

3.2. Metabonomic profile of liver aqueous extracts

PCA plot analysis showed a constant and repetitive separation into two distinct clusters according to the strain. This was observed with both diets, but the data were more consistent in animals on diet 1. Taurine, lactate and glucose in animals on both diets were the metabolites responsible for this clustering (Fig. 2). MCP1^{-/-}LDLr^{-/-} mice showed higher concentrations of taurine and lower concentrations of lactate and glucose than their counterpart LDLr^{-/-} mice on both diets. However, the effect on hepatic taurine concentration was only significant in animals fed diet 2, and the effects observed on lactate and glucose levels were only evident when mice were fed regular chow. Such metabolite variations suggest a metabolic role for MCP-1. This will require further research

in isolated hepatocytes to confirm our data and to ascertain the mechanism.

Immunohistochemistry studies in liver samples were used to confirm differences in the hepatic taurine content. The immunoreactivity for taurine was higher in the MCP-1^{-/-}LDLr^{-/-} model (Fig. 2E). Taurine was detected in most liver cells when MCP-1 was absent, whereas in LDLr^{-/-} mice the immunoreactivity for taurine was predominantly located in macrophages/Kupffer cells (Fig. 2E). We then investigated the expression of cholesterol-7 α -hydroxylase (CYP7A1) and we found that immunoreactivity for CYP7A1 in MCP-1^{-/-}LDLr^{-/-} mice was also higher than in LDLr^{-/-} mice (Fig. 2E).

4. Discussion

The increased hepatic concentration of lactate and glucose in LDLr^{-/-} mice suggests increased hepatic glucose production that is not present in the absence of MCP-1. The results obtained for taurine are consistent with previously published studies [6,7]. Taurine is found in high intracellular concentrations in most animal tissues and is mainly provided by healthy diets. As previously suggested, an increased hepatic taurine concentration could represent a defensive mechanism to modulate the inflammatory response [8,9] and/or to increase the energy expenditure [6], but the physiological function remains unknown. It is also well documented that taurine supplementation in mice fed high-fat diets increases the activity of hepatic microsomal expression of cholesterol-7 α -hydroxylase (CYP7A1), a key enzyme in the elimination of excess cholesterol from the body [7,10]. Our data suggest that it is plausible that the lower lipid liver content found in the MCP-1^{-/-}LDLr^{-/-} mice could be due to a higher CYP7A1 activity induced by the elevated hepatic taurine concentration. Conversely, the relative decrease in hepatic taurine concentration observed in mice fed diet 2 could be due to increased excretion of taurine-conjugated bile acid caused by cholesterol accumulation in the liver [11].

In summary, we propose an NMR spectroscopy approach as a comparative strategy to identify differences in liver metabolism in animal studies. When the difference in one of the groups is the lack of function of a selected gene, the comparisons are easily made and the observed variations may be attributed to the function of the gene. We suggest that this method should be incorporated into strategies inherent to the *in vivo* mouse experiments in which metabolic exploration is required.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the technical support and helpful discussions provided by Dr. Manfred Spraul and Dr. Hürmuth Schaffer (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Germany).

References

- [1] L. Gu, Y. Okada, S.K. Clinton, C. Gerard, G.K. Sukhova, P. Libby, B.J. Rollins, Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice, *Mol. Cell.* 2 (1998) 275–281.
- [2] M. Tous, N. Ferré, A. Rull, J. Marsillach, B. Coll, C. Alonso-Villaverde, J. Camps, J. Joven, Dietary cholesterol and differential monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in aorta and liver of apo E-deficient mice, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340 (2006) 1078–1084.
- [3] P. Sartipy, D.J. Loskutoff, Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (2003) 7265–7270.
- [4] A. Rull, J.C. Escola-Gil, J. Julve, N. Rotllan, L. Calpe-Berdiel, B. Coll, G. Aragones, J. Marsillach, C. Alonso-Villaverde, J. Camps, F. Blanco-Vaca, J. Joven, Deficiency in monocyte chemoattractant protein-1 modifies lipid and glucose metabolism, *Exp. Mol. Pathol.* 83 (2007) 361–366.
- [5] J. Joven, A. Rull, N. Ferré, J.C. Escola-Gil, J. Marsillach, B. Coll, C. Alonso-Villaverde, G. Aragones, J. Claria, J. Camps, The results in rodent models of atherosclerosis are not interchangeable: the influence of diet and strain, *Atherosclerosis* 195 (2007) e85–e92.

- [6] N. Tsuboyama-Kasaoka, C. Shozawa, K. Sano, Y. Kamei, S. Kasaoka, Y. Hosokawa, O. Ezaki, Taurine (2-aminoethanesulfonic acid) deficiency creates a vicious circle promoting obesity, *Endocrinology* 147 (2006) 3276–3284.
- [7] S. Murakami, Y. Kondo-Ohta, K. Tomisawa, Improvement in cholesterol metabolism in mice given chronic treatment of taurine and fed a high-fat diet, *Life Sci.* 64 (1999) 83–91.
- [8] E.O. Elvevoll, K.E. Eilertsen, J. Brox, B.T. Dragnes, P. Falkenberg, J.O. Olsen, B. Kirkhus, A. Lamglait, B. Osterud, Seafood diets: hypolipidemic and anti-atherogenic effects of taurine and n-3 fatty acids, *Atherosclerosis* 200 (2008) 396–402.
- [9] U. Warskulat, F. Zhang, D. Häussinger, Taurine is an osmolyte in rat liver macrophages (Kupffer cells), *J. Hepatol.* 26 (1997) 1340–1347.
- [10] U. Warskulat, E. Borsch, R. Reinehr, B. Heller-Stilb, I. Mojmönnhoff, D. Buchczyk, M. Donner, U. Flögel, G. Kappert, S. Soboll, S. Beer, K. Pfeffer, H. Marschall, M. Gabrielsen, M. Amiry-Moghaddam, O.P. Ottersen, H.P. Dienes, D. Häussinger, Chronic liver disease is triggered by taurine transporter knockout in the mouse, *FASEB J.* 20 (2006) 574–576.
- [11] H. Yokogoshi, H. Mochizuki, K. Nanami, Y. Hida, F. Miyachi, H. Oda, Dietary taurine enhances cholesterol degradation and reduces serum and liver cholesterol concentrations in rats fed a high-cholesterol diet, *J. Nutr.* 129 (1999) 1705–1712.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLAMACIÓ COM A NEXE D'UNIÓ ENTRE OBESITAT I COMPLICACIONS METABÒLIQUES: ESTEATOSI
HEPÀTICA.

Anna Rull Aixa
DL: T-1516-2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLAMACIÓ COM A NEXE D'UNIÓ ENTRE OBESITAT I COMPLICACIONS METABÒLIQUES: ESTEATOSI
HEPÀTICA.

Anna Rull Aixa
DL: T-1516-2011

VII *ALTRES*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLAMACIÓ COM A NEXE D'UNIÓ ENTRE OBESITAT I COMPLICACIONS METABÒLIQUES: ESTEATOSI
HEPÀTICA.

Anna Rull Aixa
DL: T-1516-2011

Publicacions indexades

1. **Rull A**, García R, Fernández-Sender L, Beltrán-Debón R, Aragonès G, Alegret JM, Alonso-Villaverde C, Mackness B, Mackness M, Camps J, Martin-Paredero V, Joven J. The Role of Combined Assessment of Defense Against Oxidative Stress and Inflammation in the Evaluation of Peripheral Arterial Disease. *Curr Mol Med*. 2011
2. Joven J, Espinel E, **Rull A**, Beltrán-Debón R, Aragonès G, Rodríguez-Gallego E, Camps J, Pedro-Botet J, Sans T, Menéndez JA, Alonso-Villaverde C. Serum fatty acid synthase concentration is increased in patients with hepatitis viral infection and may assist in the prediction of liver steatosis. *J Clin Virol*. 2011; 51:199-201.
3. Aragonès G, Guardiola M, Barreda M, Marsillach J, Beltrán-Debón R, **Rull A**, Mackness B, Mackness M, Joven J, Simó JM, Camps J. Measurement of serum PON-3 concentration: method evaluation, reference values, and influence of genotypes in a population-based study. *J Lipid Res*. 2011; 52:1055-61.
4. Beltrán-Debón R*, **Rull A***, Rodríguez-Sanabria F, Iswaldi I, Herranz-López M, Aragonès G, Camps J, Alonso-Villaverde C, Menéndez JA, Micol V, Segura-Carretero A, Joven J. Continuous administration of polyphenols from aqueous rooibos (*Aspalathus linearis*) extract ameliorates dietary-induced metabolic disturbances in hyperlipidemic mice. *Phytomedicine*. 2011; 18:414-24.
5. Marsillach J, Camps J, Beltrán-Debón R, **Rull A**, Aragonès G, Maestre-Martínez C, Sabench F, Hernández M, Castillo DD, Joven J, Mackness M, Mackness B. Immunohistochemical analysis of paraoxonases-1 and 3 in human atheromatous plaques. *Eur J Clin Invest*. 2011; 41:308-14.
6. **Rull A**, Camps J, Alonso-Villaverde C, Joven J. Insulin resistance, inflammation, and obesity: role of monocyte chemoattractant protein-1 (or CCL2) in the regulation of metabolism. *Mediators Inflamm*. 2010; pii: 326580.
7. Rodríguez-Sanabria F, **Rull A**, Beltrán-Debón R, Aragonès G, Camps J, Mackness B, Mackness M, Joven J. Tissue distribution and expression of paraoxonases and chemokines in mouse: the ubiquitous and joint localisation suggest a systemic and coordinated role. *J Mol Histol*. 2010; 41:379-86.
8. Aragonès G, Alonso-Villaverde C, Oliveras-Ferraros C, Beltrán-Debón R, **Rull A**, Rodríguez-Sanabria F, Camps J, Martín AV, Menéndez JA, Joven J. Infection with HIV and HCV enhances the release of fatty acid synthase into circulation: evidence for a novel indicator of viral infection. *BMC Gastroenterol*. 2010;10:92.
9. Alonso-Villaverde C, Aragonès G, Beltrán-Debón R, Fernández-Sender L, **Rull A**, Rodríguez-Sanabria F, Marsillach J, Pardo-Reche P, Camps J, Joven J. Host-pathogen interactions in the development of metabolic disturbances and atherosclerosis in HIV infection: the role of CCL2 genetic variants. *Cytokine*. 2010; 51:251-8.

10. Rodríguez-Sanabria F*, **Rull A***, Aragonès G, Beltrán-Debón R, Alonso-Villaverde C, Camps J, Joven J. Differential response of two models of genetically modified mice fed with high fat and cholesterol diets: relationship to the study of non-alcoholic steatohepatitis. *Mol Cell Biochem.* 2010; 343:59-66.
11. Aragonès G, Beltrán-Debón R, **Rull A**, Rodríguez-Sanabria F, Fernández-Sender L, Camps J, Joven J, Alonso-Villaverde C. Human immunodeficiency virus-infection induces major changes in high-density lipoprotein particle size distribution and composition: the effect of antiretroviral treatment and disease severity. *Clin Chem Lab Med.* 2010; 48:1147-52.
12. Marsillach J, Aragonès G, Mackness B, Mackness M, **Rull A**, Beltrán-Debón R, Pedro-Botet J, Alonso-Villaverde C, Joven J, Camps J. Decreased paraoxonase-1 activity is associated with alterations of high-density lipoprotein particles in chronic liver impairment. *Lipids Health Dis.* 2010; 9:46.
13. Vinaixa M, Rodríguez MA, **Rull A**, Beltrán R, Bladé C, Brezmes J, Cañellas N, Joven J, Correig X. Metabolomic assessment of the effect of dietary cholesterol in the progressive development of fatty liver disease. *J Proteome Res.* 2010; 9:2527-38.
14. Parra S, Marsillach J, Aragonès G, **Rull A**, Beltrán-Debón R, Alonso-Villaverde C, Joven J, Camps J. Methodological constraints in interpreting serum paraoxonase-1 activity measurements: an example from a study in HIV-infected patients. *Lipids Health Dis.* 2010; 9:32.
15. Camps J, Marsillach J, **Rull A**, Alonso-Villaverde C, Joven J. Interrelationships between paraoxonase-1 and monocyte chemoattractant protein-1 in the regulation of hepatic inflammation. *Adv Exp Med Biol.* 2010; 660:5-18.
16. **Rull A**, Beltrán-Debón R, Aragonès G, Rodríguez-Sanabria F, Alonso-Villaverde C, Camps J, Joven J. Expression of cytokine genes in the aorta is altered by the deficiency in MCP-1: effect of a high-fat, high-cholesterol diet. *Cytokine.* 2010; 50:121-8.
17. Aragonès G, Beltrán R, **Rull A**, Marsillach J, Rodríguez F, Alí SB, Fernández-Sender L, Camps J, Joven J, Alonso-Villaverde C. Pitfalls in measuring high-density lipoprotein cholesterol concentrations in HIV-infected patients. *HIV Med.* 2010; 11:260-5.
18. Parra S, Coll B, Aragonés G, Marsillach J, Beltrán R, **Rull A**, Joven J, Alonso-Villaverde C, Camps J. Nonconcordance between subclinical atherosclerosis and the calculated Framingham risk score in HIV-infected patients: relationships with serum markers of oxidation and inflammation. *HIV Med.* 2010; 11:225-31.
19. Beltrán-Debón R, Alonso-Villaverde C, Aragonès G, Rodríguez-Medina I, **Rull A**, Micol V, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A, Camps J, Joven J. The aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* calices modulates the production of monocyte chemoattractant protein-1 in humans. *Phytomedicine.* 2010; 17:186-91.

20. Rull A, Rodríguez F, Aragonès G, Marsillach J, Beltrán R, Alonso-Villaverde C, Camps J, Joven J. Hepatic monocyte chemoattractant protein-1 is upregulated by dietary cholesterol and contributes to liver steatosis. *Cytokine*. 2009; 48:273-9.
21. Marsillach J, Oliveras-Ferraro C, Beltrán R, Rull A, Aragonès G, Alonso-Villaverde C, Vázquez-Martin A, Joven J, Menéndez JA, Camps J. Serum concentrations of extracellular fatty acid synthase in patients with steatohepatitis. *Clin Chem Lab Med*. 2009;47:1097-9.
22. Rull A, Vinaixa M, Angel Rodríguez M, Beltrán R, Brezmes J, Cañellas N, Correig X, Joven J. Metabolic phenotyping of genetically modified mice: An NMR metabolomic approach. *Biochimie*. 2009; 91:1053-7.
23. Marsillach J, Camps J, Ferré N, Beltrán R, Rull A, Mackness B, Mackness M, Joven J. Paraoxonase-1 is related to inflammation, fibrosis and PPAR delta in experimental liver disease. *BMC Gastroenterol*. 2009; 9:3.
24. Marsillach J, Ferré N, Camps J, Riu F, Rull A, Joven J. Moderately high folic acid supplementation exacerbates experimentally induced liver fibrosis in rats. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2008; 233:38-47.
25. Marsillach J, Ferré N, Camps J, Rull A, Beltrán R, Joven J. Changes in the expression of genes related to apoptosis and fibrosis pathways in CCl4-treated rats. *Mol Cell Biochem*. 2008; 308:101-9.
26. Rull A, Escolà-Gil JC, Julve J, Rotllan N, Calpe-Berdiel L, Coll B, Aragonès G, Marsillach J, Alonso-Villaverde C, Camps J, Blanco-Vaca F, Joven J. Deficiency in monocyte chemoattractant protein-1 modifies lipid and glucose metabolism. *Exp Mol Pathol*. 2007; 83:361-6.
27. Joven J, Rull A, Ferré N, Escolà-Gil JC, Marsillach J, Coll B, Alonso-Villaverde C, Aragonès G, Claria J, Camps J. The results in rodent models of atherosclerosis are not interchangeable: the influence of diet and strain. *Atherosclerosis*. 2007; 195:e85-92.
28. Tous M, Ribas V, Escolà-Gil JC, Blanco-Vaca F, Calpe-Berdiel L, Coll B, Ferré N, Alonso-Villaverde C, Rull A, Camps J, Joven J. Manipulation of inflammation modulates hyperlipidemia in apolipoprotein E-deficient mice: a possible role for interleukin-6. *Cytokine*. 2006; 34:224-32.
29. Tous M, Ferré N, Rull A, Marsillach J, Coll B, Alonso-Villaverde C, Camps J, Joven J. Dietary cholesterol and differential monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in aorta and liver of apo E-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 340:1078-84.
30. Ferré N, Marsillach J, Camps J, Rull A, Coll B, Tous M, Joven J. Genetic association of paraoxonase-1 polymorphisms and chronic hepatitis C virus infection. *Clin Chim Acta*. 2005; 361:206-10.

*Both authors contributed equally to the work

Publicacions no indexades

1. Alonso-Villaverde C, Aragonès G, Beltrán-Debón R, Fernández-Sender L, Rull A, Camps J, Alegret JM, Joven J. Treatment of hypertriglyceridemia and HIV: fenofibrate-induced changes in the expression of chemokine genes in circulating leukocytes. *AIDS Res Ther.* 2009; 6:26.
2. Montse Guardiola. Mònica Tous. Joan Carles Vallvé. **Anna Rull.** Lluís Masana. Jorge Joven. Josep Ribalta. La grasa saturada en la dieta disminuye la expresión hepática de APOA5 en ratones deficientes en apo E. *Clin Invest Arterioscl.* 2007; 19:22-9_
3. Jorge Joven. Mònica Tous. **Anna Rull.** Experimentos con ratones susceptibles a arteriosclerosis. Ventajas, inconvenientes y aspectos que considerar. *Clin Invest Arterioscl.* 2006; 18:155-64.

Capítols de llibre

1. Camps J, Marsillach J, Rull A, Alonso-Villaverde C, Joven J. Interrelationships between paraoxonase-1 and monocyte chemoattractant protein-1 in the regulation of hepatic inflammation. *Paraoxonases in Inflammation, Infection, and Toxicology, Advances in Experimental Medicine and Biology* 660, DOI 10.2007/978-1-60761-350-3_2. Human Press, Springer Science+Business Media, LLC 2010.

Participació a Congressos

- 79th Annual Congress of the European Atherosclerosis Society (EAS), Gothenburg 2011
- 4th International Conference on Paraoxonases, Pineda 2010
- 78th Annual Congress of the European Atherosclerosis Society (EAS), Hamburg 2010
- EASL Special Conference on NAFLD/NASH and Related Metabolic Disease, Bologna 2009.
- VI Jornadas del Comité Científico de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, Granada 2008
- 77th Annual Congress of the European Atherosclerosis Society (EAS), Turkey 2008.
- XXI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Arteriosclerosis, Madrid 2008
- VII Congreso Catalán de Ciencias del Laboratorio Clínico, Tarragona 2006.

ABREVIATURES

12/15LO: *12/15 Lipoxygenase*

ACC: *Acetil-CoA carboxilase*

AMPK: *Adenosine-5'-monophosphate-activated protein kinase*

AP-1: *Activator protein-1*

ATF: *Activating transcription family*; exemple ATF-6: *Activating transcription factor 6*

BIP: *Immunoglobulin-heavy-chain-binding protein*

BLC2: *B-cell lymphoma formation*

CCR2: *C-C motif chemokine receptor 2*

CPT1: *Carnitine palmitoyltransferase 1*

CREB: *cAMP response element-binding*

CREBH: *cyclic-AMP-responsive-element -binding protein H*

DAG: *Diacylglycerol*

DARC: *Duffy antigen receptor for chemokines*

DKO: *Double knockout*

eIF2 α : *Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha*

FAS: *Fatty acid synthase*

FFA: *Free fatty acid*

FoxO: *Forkhead box protein O*

G6Pase: *Glucose-6-phosphatase*

GSK3: *Glycogen synthase kinase-3*

IKK: *I kappa B kinase*

IL-(n): *Interleuquina (1, 2, 6, etc...), exemple IL-1, IL-6*

INF- γ : *Inerferon gamma*

IRE-1: *Inositol-requiring enzyme 1*

JNK: *c-jun N-terminal kinase*

KO: *Knockout*

LDL: *Low density lipoprotein*

LPC: *Lysophosphatidylcholine*

LPL: *Lipoprotein lipase*

LPS: *Lypopolysacharide*

LXR: *Liver X receptor*

M1: *Classically-activated macrophages*

M2: *Alternatively activated macrophages*
MCP: *Monocyte chemoattractant protein (Ex: MCP-1, MCP-2)*
MCP-1: *Monocyte chemoattractant protein-1*, també coneguda com CCL2
MUFA: *Monounsaturated fatty acyls*
NADPH: *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*
NALFD: *Nonalcoholic fatty liver disease*
NASH: *Nonalcoholic steatohepatitis*
NF- κ B: *Nuclear factor κ B*
OMS: Organització Mundial de la Salut
PDGF: *Platelet-derived growth factor*
PEPCK: Phosphoenolpyruvate carboxylase
PERK: *Pancreatic Endoplasmic Reticulum Kinase*
PI3K: *Phosphatidylinositol-3-kinase*
PKC: *Protein kinase C*
PPAR α : *Peroxisome proliferator-activated receptor alpha*
PPAR β o PPAR δ : *Peroxisome proliferator-activated receptor beta*
PPAR γ : *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*
PPARGC1: *Peroxisome proliferator-activated receptor γ co-activator 1*
PUFA: *Polyunsaturated fatty acyls*
RBP4: *Retinol binding protein-4*
RE: *Reticle endoplasmàtic*
ROS: *Reactive oxygen species*
SREBP: *Sterol Regulatory Element-Binding Proteins*
SNPs: *Single Nucleotide Polymorphisms*
Th1 & Th2: *Type 1 and 2 T helper cells*
THP-1: *Human acute monocytic leukemia cell line*
TNF- α : *Tumor necrosis factor alpha*
TRAF-2: *TNF receptor-associated factor 2*
UPR: *Unfolded protein response*
VLDL: *Very-low density lipoprotein*
XBP-1: *X-box-binding protein 1*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLAMACIÓ COM A NEXE D'UNIÓ ENTRE OBESITAT I COMPLICACIONS METABÒLIQUES: ESTEATOSI
HEPÀTICA.

Anna Rull Aixa
DL: T-1516-2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

INFLAMACIÓ COM A NEXE D'UNIÓ ENTRE OBESITAT I COMPLICACIONS METABÒLIQUES: ESTEATOSI
HEPÀTICA.

Anna Rull Aixa

DL: T-1516-2011