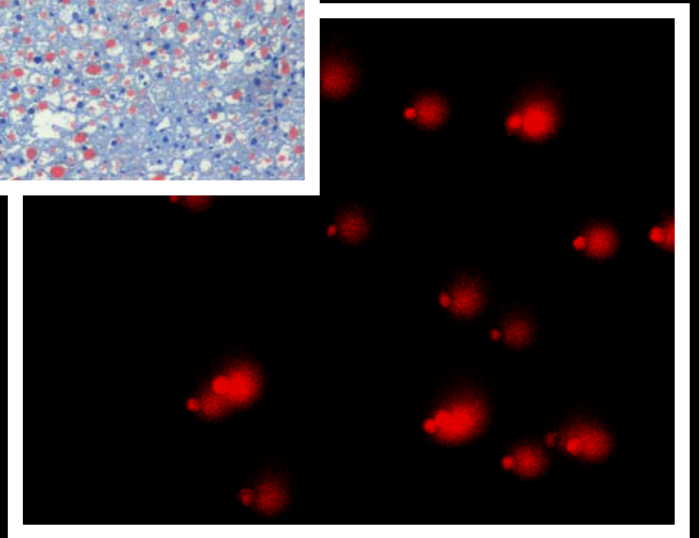
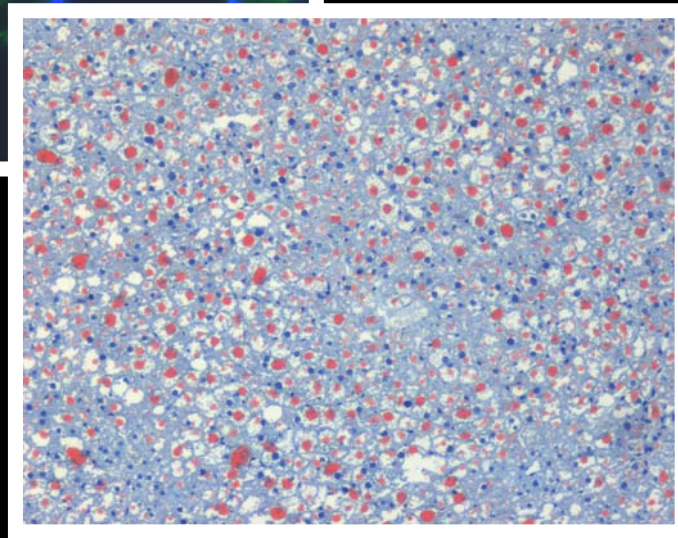
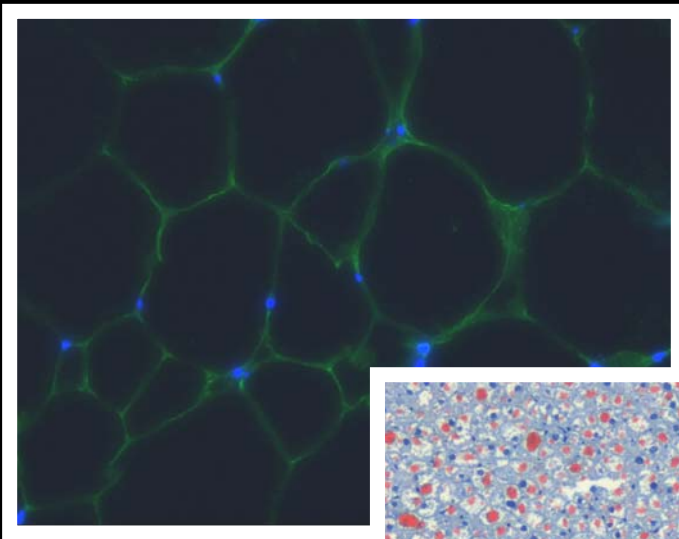


EFFECTOS PROTECTORES DE LOS ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3 EN EL HÍGADO Y EN EL TEJIDO ADIPOSO

ANA GONZÁLEZ PÉRIZ
2009



Tesis Doctoral
Universitat de Barcelona
Facultat de Medicina



UNIVERSITAT DE BARCELONA

Facultat de Medicina

**EFFECTOS PROTECTORES DE LOS ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3
EN EL HÍGADO Y EN EL TEJIDO ADIPOSO**

Memoria presentada por

ANA GONZÁLEZ PÉRIZ

para optar al título de Doctora en Biología

Trabajo realizado bajo la dirección del **Dr. Joan Clària Enrich**, en el Servicio de
Bioquímica y Genética Molecular de l'Hospital Clínic de Barcelona

Ana González Périz

Dr. Joan Clària Enrich
Director

Tesis inscrita en el programa de doctorado de Biopatología en Medicina, del
Departament de Medicina, Facultat de Medicina, bienio 2004-2006.

A Julia y Montse

ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidónico
ALA	Ácido α -linolénico
ALT	Alanina aminotransferasa
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AMPK	Quinasa activada por AMPc
ASA	Ácido acetil salicílico
ATP	Adenosín trifosfato
BHT	Butilhidrotolueno
BSA	Albúmina de suero bovino
CCl ₄	Tetracloruro de carbono
COX	Ciclooxigenasa
DHA	Ácido docosahexaenoico
DGLA	Ácido dihomo- γ -linoleico
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMT2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPA	Ácido docosapentaenoico
DPBS ^{-/-}	Solución tamponada con fosfato de Dulbecco sin calcio ni magnesio
EFA	Ácidos grasos esenciales
EHNA	Enfermedad hepática no alcohólica
EMEM	Medio mínimo esencial de Eagle
EPA	Ácido eicosapentaenoico
EtOH	Etanol

FASN	Sintasa de ácidos grasos
FBS	Suero fetal bovino
GC	Cromatografía de gases
GLA	Ácido γ -linoleico
GLUT	Transportador de glucosa
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno, agua oxigenada
H ₂ O _d	Agua destilada
HCC	Hepatocarcinoma celular
HDHA	Ácido hidroxidocosahexaenoico
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HETEs	Ácidos hidroieicosaenoicos
HNE	Trans-4-hidroxi-2-nonenal
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
IL	Interleuquina
IRS	Sustrato del receptor de la insulina
ITT	Test de tolerancia a la insulina
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos-1
MDA	Malondialdehido
MeOH	Metanol
MS	Espectrometría de masas
MUFAs	Ácidos grasos monoinsaturados
NPD1	Neuroprotectina D1
LA	Ácido linoleico
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LTs	Leucotrienos

LO	Lipoxigenasa
OA	Ácido oleico
PA	Ácido palmitoleico
PAI	Inhibidor del activador del plasminógeno
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PD1	Protectina D1
PGs	Prostaglandinas
PLs	Fosfolipasas
PPAR	Receptor activado por proliferadores de peroxisomas
PUFAs	Ácidos grasos poliinsaturados
RNAm	Ácido ribonucleico mensajero
ROS	Especies reactivas del oxígeno
Rv	Resolvina
SCD	Estearoil-CoA desaturasa
SREBP	Proteína de unión al elemento de respuesta a los esteroides
T ^a	Temperatura
TAM	Tejido adiposo marrón
TAB	tejido adiposo blanco
TG	Triglicéridos
TGF	Factor de crecimiento transformante
TNF	Factor de necrosis tumoral
TXs	Tromboxanos
UCP	Proteína desacopladora
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad

INTRODUCCIÓN	1
I.- ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS	3
1.- Precursores de los ácidos grasos omega-6 y omega-3	4
2.- Metabolismo de los ácidos grasos omega-6 y omega-3	5
II.- DERIVADOS BIOACTIVOS DE LOS ÁCIDOS GRASOS OMEGA-6 Y OMEGA-3	7
1.- Derivados de los ácidos grasos omega-6: los eicosanoides	7
2.- Derivados de los ácidos grasos omega-3	9
2.1.- Resolvinas	10
2.1.1.- Resolvinas derivadas del EPA	11
2.1.2.- Resolvinas derivadas del DHA	13
2.2.- Protectinas	15
III.- INFLAMACIÓN HEPÁTICA	15
1.- El sinusoides hepático	16
2.- Producción hepática de eicosanoides	17
3.- Fibrogénesis hepática	18
4.- Progresión y regresión de la fibrosis hepática	18
5.- Cirrosis hepática	19
6.- Ratones tratados con CCl ₄	20
IV.- INFLAMACIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO Y PATOLOGÍAS ASOCIADAS	21
V.- ENFERMEDAD HEPÁTICA NO ALCOHÓLICA	23
1.- Prevalencia de la EHNA	23
2.- Progresión de la EHNA	24
2.1.- Esteatosis hepática	25
2.2.- Esteatohepatitis no alcohólica	26
2.2.1.- Estrés oxidativo y peroxidación lipídica	26
2.2.2.- Disfunción mitocondrial	27
2.2.3.- Inflamación	27
2.3.- Fibrosis y cirrosis hepática	29

VI.- TEJIDO ADIPOSO	29
1.- Tejido adiposo marrón (TAM) y tejido adiposo blanco (TAB)	29
1.1.- Características del TAM	29
1.2.- Características del TAB	30
2.- Clasificación del TAB	31
3.- Estructura del TAB	32
3.1.- Adipocitos	33
3.2.- Células estromales vasculares	34
4.- Adipoquinas	34
4.1.- Adiponectina	35
4.2.- Leptina	39
4.2.1-. Ratones <i>ob/ob</i> deficientes en leptina	40
4.3.- Resistina	40
OBJETIVOS	43
RESULTADOS	47
I.- ARTÍCULO 1	49
II.- ARTÍCULO 2	65
DISCUSIÓN	83
CONCLUSIONES	95
BIBLIOGRAFÍA	99
ANEXO 1: MATERIAL Y MÉTODOS	117
I.- MATERIALES BIOLÓGICOS	119
1.- Animales	119
2.- Células	119
3.- Anticuerpos	119

4.- Plásmidos	120
II.- TAMPONES Y MEDIOS	121
1.- Tampones y soluciones	121
2.- Medios de cultivo celular	122
3.- Sondas TaqMan®	122
III.- ESTUDIOS CON ANIMALES	123
1.- Ratones 129SV alimentados con ácidos grasos omega-3 y tratados con CCl ₄	123
2.- Ratones <i>ob/ob</i> alimentados con ácidos grasos omega-3	124
2.1.- Grupos adicionales de estudio	124
2.2.- Test de tolerancia a la insulina (ITT)	125
2.3.- Sacrificio de los ratones <i>ob/ob</i>	125
IV.- ESTUDIOS CON CÉLULAS	126
1.- Incubaciones de Raw 264.7 con DHA y su metabolito 17-HDHA	126
2.- Ensayo Cometa	127
3.- Medición de los niveles de estrés oxidativo (MDA)	129
4.- Ensayos de transactivación	132
V.- ESTUDIOS CON EXPLANTES DE TEJIDO ADIPOSO	135
VI.- ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA	137
1.- Extracción de RNA	137
1.1.- TRIzol	137
1.2.- RNAqueous	138
2.- Síntesis de cDNA	140
3.- PCR a tiempo real	140
VII.- ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA	141
1.- Extracción de proteínas	141
1.1.- Proteína total de Raw 264.7	141
1.2.- Proteína total de tejido	142
2.- Cuantificación de proteína	143

2.1.- Bradford	143
2.2.- Micro BCA	143
3.- Western Blot	145
3.1.- 5-LO	145
3.2.- AMPK fosforilada y AMPK total	147
4.- Inmunohistoquímica para la detección de F4/80	150
5.- Inmunofluorescencia para la detección de adiponectina	153
VIII.- LÍPIDOS	155
1.- Extracción de lípidos de tejido	155
2.- Extracción de eicosanoides	157
2.1.- Análisis inmunoenzimático (EIA)	157
2.2.- Análisis lipidómico	158
ANEXO 2: OTRAS PUBLICACIONES	161
AGRADECIMIENTOS	177

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras de los ácidos grasos esenciales LA y ALA	4
Figura 2. Rutas biosintéticas de los ácidos grasos omega-6 y omega-3	6
Figura 3. Síntesis de eicosanoides derivados del AA y del EPA	8
Figura 4. Formación de resolvinas de la serie E	12
Figura 5. Formación de resolvinas de la serie D	14
Figura 6. Formación de protectina D1	14
Figura 7. Estructura y tipos celulares del sinusoides hepático	17
Figura 8. Alteraciones en el TAB obeso y consecuencias hepáticas	22
Figura 9. Historia natural de la EHNA	24
Figura 10. Papel del TAB en la patogénesis de la esteatohepatitis no alcohólica	28
Figura 11. Estructura del tejido adiposo	32
Figura 12. Adipoquinas producidas por el TAB	35
Figura 13. Estructuras y receptores de la adiponectina	36
Figura 14. Plásmidos utilizados en los ensayos de transactivación de PPAR γ	102

Introducción

I.- ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS

Los ácidos grasos insaturados constituyen una amplia familia de biomoléculas lipídicas cuya estructura básica consta de una cadena hidrocarbonada lineal ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$) que contiene uno o más dobles enlaces, también denominados insaturaciones, delimitada por un extremo metilo ($-\text{CH}_3$) y otro carboxilo ($-\text{COOH}$). Si la molécula contiene un solo doble enlace, el ácido graso se denomina monoinsaturado (MUFA), en cambio si contiene dos o más dobles enlaces, se denomina poliinsaturado (PUFA). Teniendo en cuenta la posición del doble enlace más cercano al extremo metilo de la cadena hidrocarbonada, que determina tanto el nombre, como las propiedades físicas y fisiológicas de los distintos MUFAs y PUFAs, se conocen 4 familias independientes de ácidos grasos insaturados:

Serie omega-3, derivados del ácido α -linolénico (ALA, 18:3n-3)

Serie omega-6, derivados del ácido linoleico (LA, 18:2n-6)

Serie omega-7, derivados del ácido palmitoleico (PA, 16:1n-7)

Serie omega-9, derivados del ácido oleico (OA, 18:1n-9)

Además de desempeñar multitud de funciones biológicas por sí mismos y a través de su conversión a potentes derivados bioactivos, los ácidos grasos insaturados tienen una función estructural primordial como componentes de los fosfolípidos, de manera que determinan la fluidez de las membranas celulares, y por tanto, el comportamiento de las enzimas y los receptores unidos a éstas.

Este trabajo de tesis doctoral está centrado en el estudio de los ácidos grasos omega-3, también conocidos como ácidos grasos ω -3 ó n-3, moléculas de 18 a 22 átomos de carbono, cuyo primer doble enlace se encuentra en el carbono 3 empezando a contar por el extremo metilo (ver Figura 1). El principal motivo de interés de los ácidos grasos omega-3 son las numerosas evidencias clínicas y experimentales de sus efectos beneficiosos en diversas patologías de índole inflamatoria, como la artritis reumatoide, la fibrosis quística, la colitis

ulcerosa, el asma, la aterosclerosis, el cáncer y la enfermedad cardiovascular (Calder, 2006) en contraposición a los ácidos grasos omega-6, conocidos por ser los precursores de potentes moléculas proinflamatorias.

1.-Precusores de los ácidos grasos omega-6 y omega-3

Los ácidos grasos linoleico (LA, 18:2n-6) y α -linolénico (ALA, 18:3n-3) son los miembros más simples de las familias de ácidos grasos omega-6 y omega-3, respectivamente (Das, 2006). Como muestra la Figura 1, a principal diferencia estructural entre las familias omega-3 y omega-6 es la posición de su primer doble enlace en la cadena hidrocarbonada.

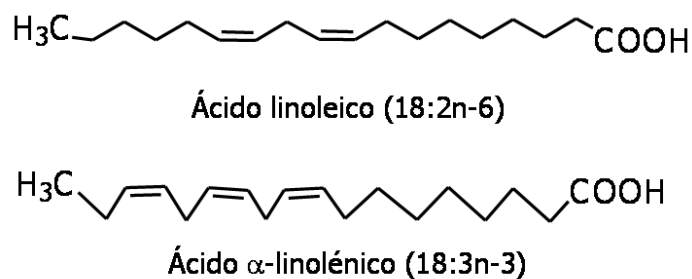


Figura 1. Estructuras de los ácidos grasos esenciales ácido linoleico (LA) y ácido α -linolénico (ALA).

Aunque LA y ALA son esenciales para nuestra supervivencia y la del resto de mamíferos, carecemos de las enzimas Δ 12- y Δ 15-desaturasa, necesarias para su síntesis. Estas enzimas, que sí se expresan en las plantas, son las responsables de la inserción de los dobles enlaces en los carbonos 6 y 3 de los ácidos grasos durante su formación. Dado que los mamíferos sólo podemos obtener los ácidos grasos LA y ALA a través de la dieta, se denominan ácidos grasos esenciales.

A pesar de que las plantas sí sintetizan LA y ALA, sus tejidos son pobres en grasas, y por tanto no son una fuente cuantitativamente importante de estos ácidos grasos esenciales.

En cambio, los aceites y margarinas vegetales, sí nos aportan cantidades importantes de LA y ALA.

2.-Metabolismo de los ácidos grasos omega-6 y omega-3

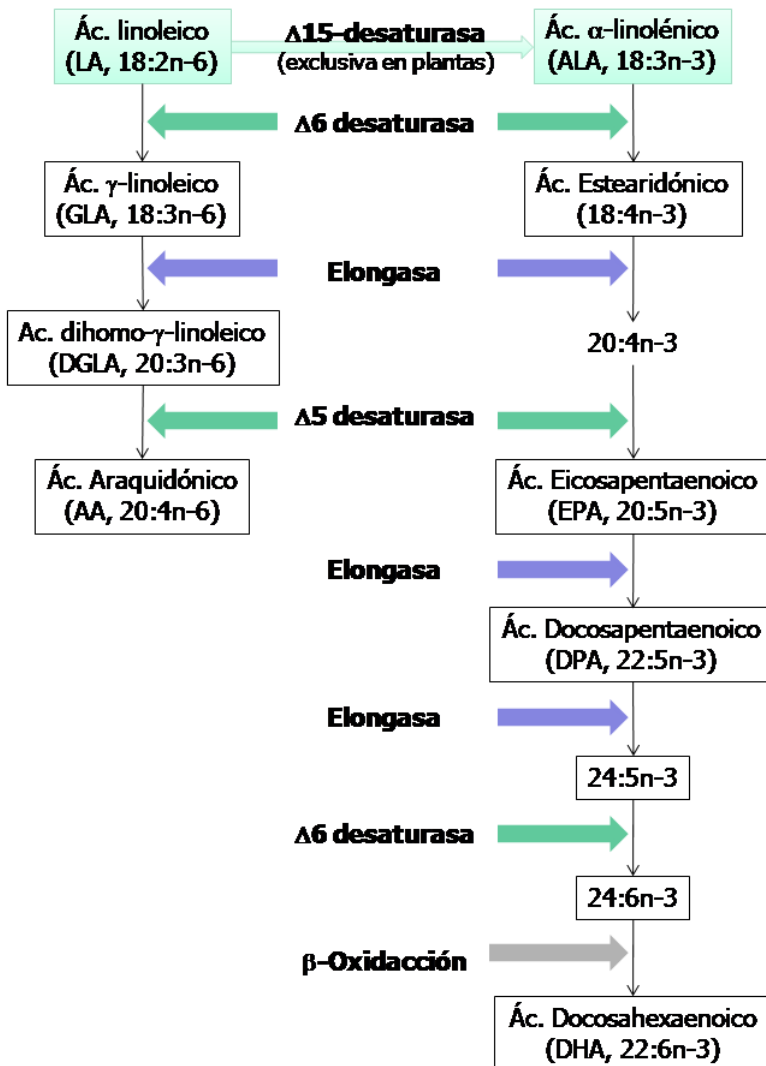
Tras ser adquiridos a través de la dieta, LA y ALA son metabolizados a través de vías enzimáticas de desaturación y elongación que tienen lugar principalmente en el hígado (ver Figura 2). La enzima $\Delta 6$ -desaturasa convierte el LA en ácido γ -linoleico (GLA, 18:3n-6) que es elongado a ácido dihomo- γ -linoleico (DGLA, 20:3n-6), el cual a su vez es el sustrato de la enzima $\Delta 5$ -desaturasa dando lugar al ácido araquidónico (AA, 20:4n-6). La misma combinación de enzimas que interviene en el metabolismo de los ácidos grasos omega-6 puede metabolizar el ALA dando lugar a toda la familia de ácidos grasos omega-3. Por esta ruta enzimática, ALA se convierte en ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) y éste a su vez, en ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3) a través de tres etapas. Primero EPA gana dos átomos de carbono, dando lugar al ácido docosapentaenoico (DPA, 22:5n-3). Luego se añaden dos átomos de carbono, dando lugar al ácido 24:5n-3, que es desaturado y se convierte en el ácido 24:6n-3. Finalmente, este ácido pierde dos átomos de carbono mediante β -oxidación originando DHA. Tal y como muestra la figura 2, el AA puede ser metabolizado de forma paralela por las mismas enzimas, produciendo por los ácidos 22:4n-6, 24:4n-6, 24:5n-6 y 22:5n-6, lo que significa que LA y ALA compiten constantemente por las mismas enzimas (Das, 2006).

PUFAs y EFAs

Los ácidos linoleico (LA, 18:2n-6), α -linolénico (ALA, 18:3n-3) y sus respectivos derivados, ácido γ -linoleico (GLA, 18:3n-6), ácido dihomo- γ -linoleico (DGLA, 20:3n-6), ácido araquidónico (AA, 20:4n-6) ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5, n-3) y ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3) son ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs, ver Figura 2).

Al carecer de las enzimas necesarias para su síntesis, solamente LA y ALA son estrictamente ácidos grasos esenciales (EFAs). A pesar de esto, tradicionalmente nos referimos a AA, EPA y DHA como EFAs porque son mucho más abundantes en la dieta que sus precursores y por tanto suponen nuestras fuentes principales de ácidos grasos omega-6 y omega-3.

Figura 2. Rutas biosintéticas de los ácidos grasos omega-6 y omega-3.



A pesar de que la conversión de EFAs (LA y ALA) en sus derivados AA, EPA y DHA es potencialmente posible, en realidad es un proceso poco eficiente en las personas adultas, de manera que lo más habitual es incorporar en nuestro organismo estos ácidos grasos no esenciales directamente a través de la dieta.

La carne y sus derivados son nuestra fuente principal de AA. Se estima que los adultos consumimos entre 50 y 300 mg al día de AA. En cambio, la

principal fuente de ácidos grasos omega-3 EPA y DHA es el pescado. Se distinguen dos clases de pescado: el *pescado magro*, que engloba a los pescados que acumulan la grasa en su hígado en forma de triglicéridos (TG), como el bacalao, y el *pescado graso*, que engloba a los que acumulan TG en su carne, el atún, el salmón y la sardina. El aceite obtenido de estas dos clases de pescado se denomina "aceite de pescado" y su principal propiedad es su altísimo contenido en ácidos grasos omega-3 EPA y DHA. Los aceites extraídos de distintos tipos de pescado contienen diferentes cantidades de PUFAs omega-3, en función de varios parámetros, como los hábitos alimentarios y las características metabólicas de cada pez. Por tanto, la

manera más eficaz de incorporar EPA y DHA a nuestro organismo es el consumo de pescado o sus aceites derivados.

II.- DERIVADOS BIOACTIVOS DE LOS ÁCIDOS GRASOS OMEGA-6 Y OMEGA-3

1.-Derivados de los ácidos grasos omega-6: los eicosanoides

El AA es el PUFA más abundante en las membranas celulares y su función principal es servir como precursor para la síntesis de una extensa familia de mediadores bioactivos conocidos como eicosanoides, que incluye la serie 2 de las prostaglandinas (PGs) y los tromboxanos (TXs), la serie 4 de los leucotrienos (LTs) y los ácidos hidroxieicosatetraenoicos (HETEs), con importantes funciones en la inflamación, el control del tono muscular de los vasos sanguíneos y la agregación plaquetaria, entre otras (Calder, 2006).

El AA de las membranas celulares es movilizado por las fosfolipasas (PLs), principalmente la PLA₂. Una vez liberado, AA es metabolizado a través de las vías de la ciclooxigenasa (COX) y la lipooxigenasa (LO), responsables de la síntesis de eicosanoides (ver Figura 3A).

Cuando AA es metabolizado a través de la vía de la COX da lugar a la formación de PGs y TXs de la serie 2. Existen dos isoformas de esta enzima: una constitutiva, conocida como COX-1, y otra inducible, expresada principalmente por las células inflamatorias, denominada COX-2, responsable del aumento de la producción de PGs tras la activación de estas células. Existen al menos 16 tipos de PGs de la serie 2, producidas de manera específica según el tipo celular. Por ejemplo, los monocitos y los macrófagos producen grandes cantidades de PGE₂ y PGF_{2α}, mientras que, los neutrófilos producen cantidades moderadas de PGE₂ y los mastocitos producen PGD₂.

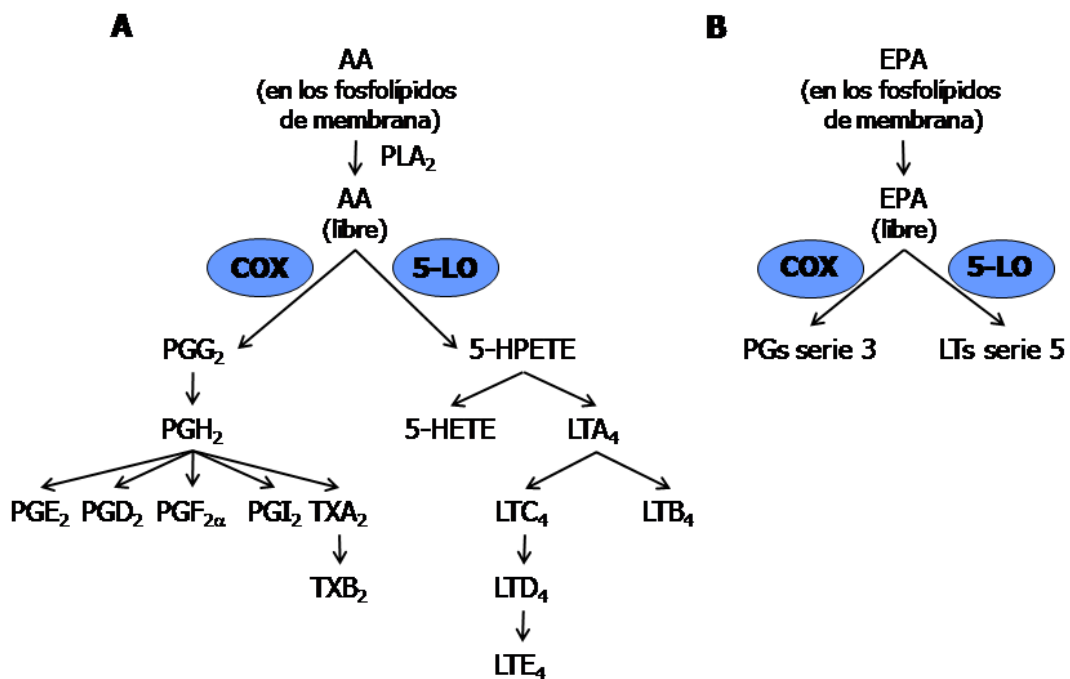
Por otro lado, cuando AA es metabolizado a través de la vía de la 5-LO da lugar al ácido 5-HETE y al ácido 5-hidroxiperoxieicosatetraenoico (5-HpETE), así como LTs de la serie 4 (LTA₄,

LTB₄, LTC₄, LTD₄ y LTE₄). La enzima 5-LO se expresa principalmente en mastocitos, monocitos, macrófagos y granulocitos.

Los eicosanoides modulan la intensidad y la duración de las respuestas inflamatorias. De todos ellos, PGE₂ y LTB₄ son los que se han estudiado más exhaustivamente. Esto ha permitido descubrir que PGE₂ posee múltiples efectos proinflamatorios, entre los que se incluyen la inducción de fiebre, el aumento de la permeabilidad vascular y la vasodilatación, así como la potenciación del dolor y el edema causados por otros agentes como la histamina. Por su parte, LTB₄ es un potente agente quimioatrayente para los leucocitos, que también aumenta la permeabilidad vascular, favorece el flujo sanguíneo local e induce la liberación de citoquinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral (TNF)- α , la interleuquina (IL)-1 y la IL-6.

En pacientes con enfermedades de carácter inflamatorio se detecta un gran aumento en la producción de eicosanoides derivados del AA, detectable por los elevados niveles sanguíneos y tisulares de estos eicosanoides.

Figura 3. Síntesis de eicosanoides derivados del AA y del EPA.



2.- Derivados de los ácidos grasos omega-3

Se ha demostrado que una dieta enriquecida con EPA y DHA conduce al aumento de estos ácidos grasos omega-3 en las membranas de las células a expensas del AA (Yaqoop *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 1985; Endres *et al.*, 1989; Sperling *et al.*, 1993; Gibney *et al.*, 1993; Caughey *et al.*, 1996; Healy *et al.*, 2000), lo que provoca la disminución de la producción de eicosanoides proinflamatorios derivados del AA (ver Figura 3A). En 1979, se describió por primera vez, que los ácidos grasos omega-3 reducían la actividad de COX y LO, así como la formación de eicosanoides derivados de los ácidos grasos omega-6 (Culp *et al.*, 1979).

Además de desplazar al AA de las membranas, los ácidos grasos omega-3 compiten con éste por ser metabolizados a través de las vías de la COX y la 5-LO (Figura 3B), dando lugar a LTs y TXs de la serie 5, y PGs de la serie 3 (Lee *et al.*, 1985; Sperling *et al.*, 1993; Von Schacky *et al.*, 1993). Los eicosanoides derivados de los ácidos grasos omega-3 se consideran biológicamente menos potentes que sus análogos derivados de AA. Las diferencias en la potencia inflamatoria entre los eicosanoides derivados de AA y de EPA se hacen muy patentes al comparar LTB₄ con LTB₅. Por ejemplo, LTB₅ es un agente quimioatrayente de neutrófilos entre 100 y 10 veces menos potente que su análogo LTB₄, por lo que es considerado menos proinflamatorio (Goldman *et al.*, 1983; Lee *et al.*, 1984). Otros estudios (Bagga *et al.*, 2003) han comparado los efectos de PGE₂ y PGE₃ sobre la producción de citoquinas en líneas celulares y células humanas, demostrando que PGE₃ induce una menor expresión génica de COX-2 y una menor producción de IL-6. Es importante destacar que los eicosanoides derivados de los ácidos grasos omega-6 y omega-3 comparten los receptores en las mismas células diana, de manera que sus efectos son antagónicos.

Recientemente se han identificado varias familias nuevas de mediadores lipídicos bioactivos que juegan un papel clave en la resolución de la inflamación. Sorprendentemente, las dos familias más importantes de estos mediadores, conocidas como resolvinas y protectinas, provienen de los ácidos grasos omega-3 EPA y DHA (Serhan *et al.*, 2008). Estos compuestos han despertado un enorme interés por su alta bioactividad y su posible participación en la mayoría de los efectos beneficiosos atribuidos a los ácidos grasos omega-3. En la actualidad, ya se han caracterizado las estructuras moleculares de varias de estas moléculas, entre las que destacan resolvina E1 y protectina D1 (Arita *et al.*, 2005a; Serhan *et al.*, 2006), y algunos de sus mecanismos de acción en varios modelos experimentales de daño, como colitis experimental, peritonitis, daño por isquemia/reperfusión y daño en la córnea, en los que han demostrado su potente acción protectora (Arita *et al.*, 2005a; Arita *et al.*, 2005b; Marcheselli *et al.*, 2003; Gronert *et al.*, 2005). Este proyecto de tesis doctoral es el primer trabajo que demuestra la formación de resolvinas y protectinas en el hígado y el tejido adiposo de ratones.

2.1.- Resolvinas

La primera resolvina descrita se identificó a partir de exudados obtenidos durante la resolución espontánea, en un modelo murino de inflamación basado en la formación de bolsas de aire en la zona dorsal. Se denominó *resolvina* precisamente por su potente acción en la regulación de la resolución. Las resolvinas presentan estructuras químicas únicas desde el punto de vista estructural que determinan las series E y D, derivadas del EPA y el DHA, respectivamente.

2.1.1.- Resolvinas derivadas del EPA

Formación y estructura:

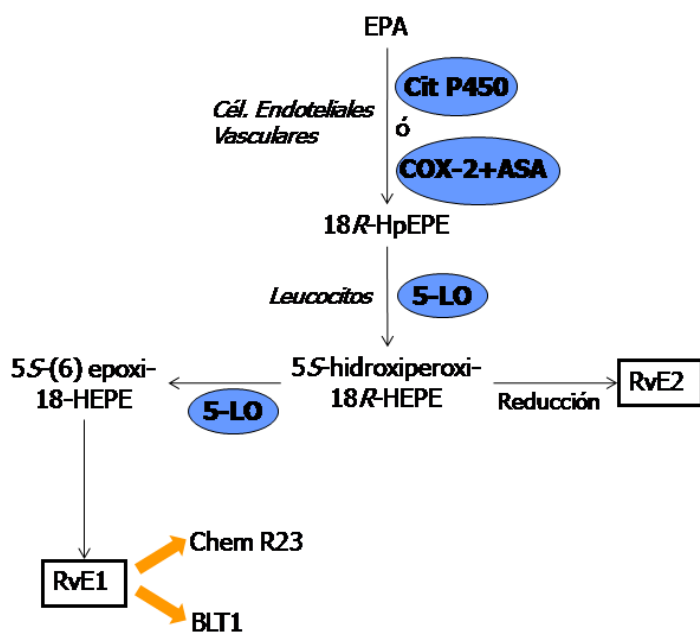
La primera resolvinas, denominada resolvinas (Rv)E1 o ácido 5*S*,12*R*,18*R*-trihidroxi-6*Z*,8*E*,10*E*,14*Z*,16*E*-eicosapentaenoico, fue aislada en el año 2000 en el modelo murino experimental citado anteriormente. RvE1 demostró una gran capacidad para reducir la inflamación *in vivo* y bloquear la migración transendotelial de neutrófilos humanos *in vitro* (Serhan *et al.*, 2000).

En 2005, se consiguió reproducir la síntesis *in vitro* de RvE1 a partir del EPA en células endoteliales vasculares humanas tratadas con ácido acetil salicílico (ASA) (Arita *et al.*, 2005a). El primer paso de la síntesis de resolvinas es la conversión de EPA en 18*R*-HEPE, el cual es liberado por las células endoteliales y captado por los neutrófilos, convirtiéndolo en 5(6)epóxido, que finalmente dará lugar a RvE1. En el suero de las personas sanas se detectan niveles de RvE1 suficientes ejercer efectos biológicos. Al recibir ASA y/o EPA, los niveles plasmáticos de RvE1 aumentan significativamente (Figura 4).

El segundo miembro de la serie E de las resolvinas es RvE2 (Figura 4), también denominada ácido 5*S*,18-dihidroxi-eicosapentaenoico. Esta molécula también es sintetizada a partir de 18*R*-HEPE, y ejerce acciones antiinflamatorias muy potentes (Tjonahen *et al.*, 2006).

El entorno local de los leucocitos determina la producción de mediadores proinflamatorios o antiinflamatorios, a través de una regulación espacio-temporal muy controlada de la expresión de 5-LO en estas células.

Figura 4. Formación de resolvinas de la serie E.



En microorganismos y mamíferos, las enzimas del citocromo P450 pueden convertir el EPA en 18-HEPE, precursor de las resolvinas. Es posible que los microorganismos presentes en los sitios de inflamación contribuyan a la producción de resolvinas de la serie E en los humanos (Serhan *et al.*, 2000; Arita *et al.*, 2005c).

Receptores:

Hasta el momento, se conocen dos receptores implicados en las acciones antiinflamatorias de RvE1. En primer lugar se ha identificado el receptor acoplado a proteína G ChemR23, también conocido como "chemokine-like receptor 1" (CMKLR1), expresado en varios tejidos y órganos de humano y ratón (Arita *et al.*, 2005a; Campbell *et al.*, 2007; Arita *et al.*, 2007). También se ha demostrado recientemente que la proteína BLT1, conocida por ser el receptor 1 de LTB₄, interactúa de manera específica con RvE1 en los neutrófilos humanos (Arita *et al.*, 2007).

Acciones:

A concentraciones nanomolares, RvE1 es capaz de reducir de manera significativa la migración transendotelial de los neutrófilos humanos, la migración de las células dendríticas y la producción de IL-12 (Serhan *et al.*, 2002; Arita *et al.*, 2005a).

RvE1 presenta potentes acciones protectoras *in vivo* en diferentes modelos de enfermedad, frente al daño tisular mediado por leucocitos y a la producción excesiva de mediadores proinflamatorios (Arita *et al.*, 2005a; Arita *et al.*, 2005b; Marcheselli *et al.*, 2003; Gronert *et al.*, 2005).

2.1.2.-Resolvinas derivadas del DHA

DHA es el precursor de dos grupos adicionales de resolvinas, denominados series 17S-D y 17R-D, que se producen a través de dos vías biosintéticas diferentes durante la resolución de la inflamación. Las Rvs de la serie D ejercen potentes acciones antiinflamatorias y son particularmente interesantes en el sistema nervioso porque estructuras como el cerebro, las sinapsis y la retina contienen altas concentraciones de DHA.

Formación y estructura:

Resolvina 17S de la serie D: El DHA es convertido por la LO en 4 resolvinas distintas, RvD1 a RvD4. Todas tienen en común el grupo "17S-hidroxi" (ver Figura 5).

Resolvina 17R de la serie D: Estas resolvinas son conocidas como resolvinas desencadenadas por aspirina y se caracterizan por la presencia del grupo "17R-hidroxi" en lugar del "17S-hidroxi" (Figura 5). Se forman a partir de DHA en presencia de ASA, que acetila la COX-2 de las células endoteliales y modifica su actividad.

Acciones:

17S-RvD1 y 17R-RvD1 son moléculas con potentes acciones antiinflamatorias y antifibróticas, capaces de detener la transmigración endotelial de los neutrófilos, la activación de macrófagos e inhibir la transcripción de citoquinas proinflamatorias, en dosis nanomolares (Serhan *et al.*, 2002; Hong *et al.*, 2003). Se ha demostrado que RvD1 es producida en respuesta al daño por isquemia/reperfusión y que la administración exógena

de RvD1 reduce de manera efectiva el daño provocado por isquemia/reperfusión (Duffield *et al.*, 2006).

Figura 5. Formación de resolvinas de la serie D.

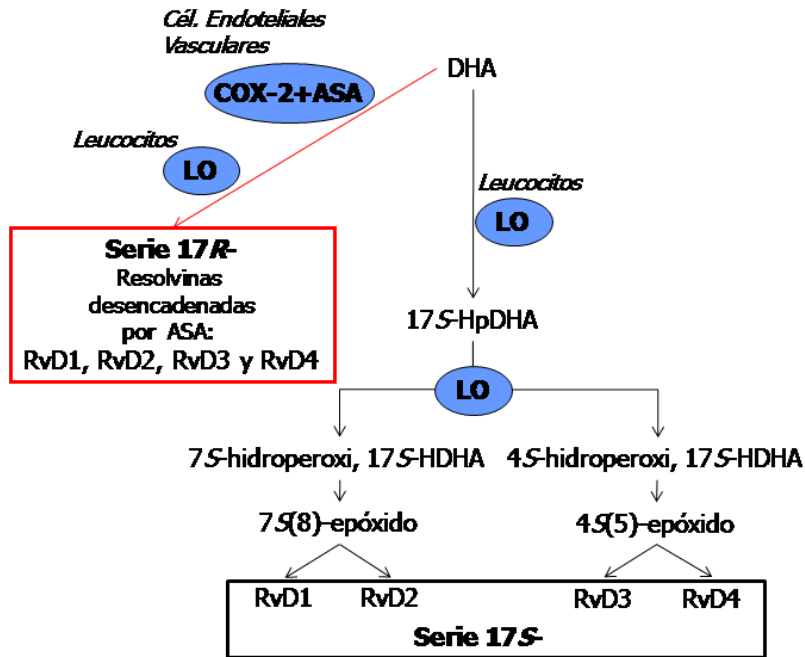
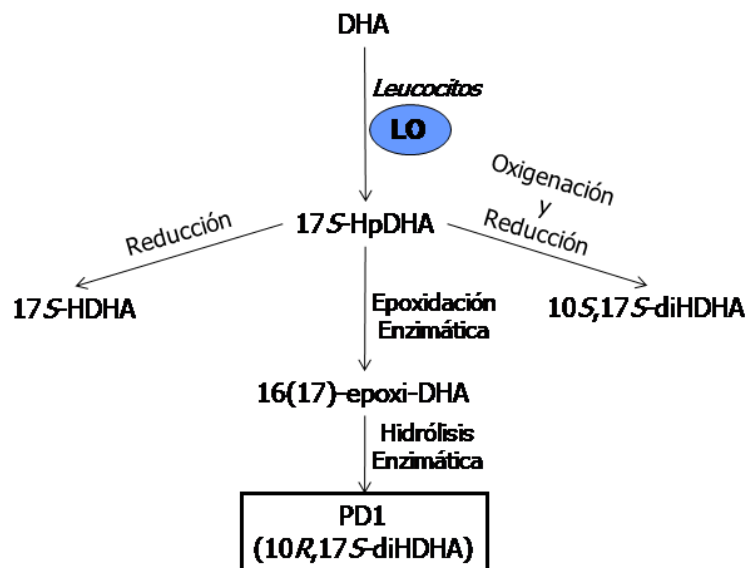


Figura 6. Formación de protectina D1.



2.2.-Protectinas

Formación y estructura:

Además de resolvinas, el DHA también da origen a una familia de moléculas llamadas protectinas (ver Figura 6). La síntesis de protectinas es iniciada por la LO de los leucocitos, con la formación de un intermediario que contiene el grupo "17S-hidroperóxido", común con la vía de formación de las resolvinas de la serie 17S-D. Este intermediario puede dar lugar a varias moléculas, entre ellas el 10*R*,17*S*-diHDHA, actualmente conocida como protectina D1 (PD1), por sus probados efectos protectores frente a la inflamación. La protectina D1 sintetizada en tejidos neurales es denominada neuroprotectina D1 (NPD1). Existen varias moléculas con el grupo "10,17-hidroxi", pero de todas ellas, PD1 es la que presenta acciones más potentes (Serhan *et al.*, 2006).

Acciones:

Estudios en varios modelos experimentales de daño, como la retinopatía, daño en la córnea, la isquemia/reperfusión y el asma (Connor *et al.*, 2007; Gronert *et al.*, 2005; Marcheselli *et al.*, 2003; Duffield *et al.*, 2006; Levy *et al.*, 2007) han demostrado que PD1 es varias magnitudes logarítmicas más potente que su precursor DHA en cuanto a acciones beneficiosas.

La formación de resolvinas y protectinas a partir de EPA y DHA, cuyos efectos protectores y antiinflamatorios son mucho más potentes que los de sus precursores, ofrece una explicación para los mecanismos endógenos de los efectos beneficiosos de los ácidos grasos omega-3, EPA y DHA.

III.- INFLAMACIÓN HEPÁTICA Y ENFERMEDAD HEPÁTICA CRÓNICA

En todos los tejidos de nuestro organismo, la inflamación es la primera reacción frente a cualquier agresión provocada por agentes externos mecánicos, biológicos o químicos que provocan una lesión tisular. Durante este proceso se activa la síntesis de eicosanoides

proinflamatorios derivados del AA liberado de las membranas celulares (ver *apartado II.1.* de esta sección) y de citoquinas producidas por las células del sistema inmunitario. La finalidad de la respuesta inflamatoria es la restauración de la estructura y la función del tejido afectado. No obstante, cuando la causa de daño tisular es crónica, bien porque no puede eliminarse o porque está descontrolada, la respuesta inflamatoria está permanentemente activada y se convierte también en un proceso crónico. La inflamación crónica está relacionada con un amplio abanico de patologías como la artritis reumatoide, la fibrosis quística, la colitis ulcerosa, el asma, la aterosclerosis, el cáncer y la enfermedad cardiovascular (Calder, 2006).

En el hígado, la inflamación crónica puede ser desencadenada por múltiples factores entre los que destacan virus, tóxicos como el alcohol, enfermedades autoinmunes, la colestasis crónica, desórdenes metabólicos o defectos genéticos. El resultado de este estado inflamatorio descontrolado es el daño tisular y la acumulación de proteínas de matriz extracelular, que favorecen el desarrollo de fibrosis hepática que puede evolucionar hasta cirrosis (Lotersztajn *et al.*, 2005).

1.- El sinusoide hepático

Los hepatocitos se distribuyen formando pasillos muy estrechos denominados sinusoides, por los cuales fluye la sangre a través del hígado, de modo que equivalen a los capilares de otros tejidos. Los sinusoides son las unidades funcionales del hígado y presentan todos los tipos celulares que conforman este órgano (Figura 7). Por un lado, están los hepatocitos, que son el tipo celular mayoritario, concretamente, suponen el 80% de la población celular del hígado. Por otro lado, están las células no parenquimales, término que engloba a las células de Kupffer, las células hepáticas estrelladas y las células endoteliales sinusoidales (Figura 7). Las células de Kupffer son los macrófagos residentes del hígado y, por tanto, son los principales responsables de la defensa de este órgano a través de la producción de eicosanoides en respuesta a

cualquier estímulo inflamatorio. Las células de Kupffer se encuentran en el lumen del sinusoides, en contacto directo con las células endoteliales, pero también con los hepatocitos y las células hepáticas estrelladas mediante las prolongaciones que emiten a través del espacio de Disse. Por su parte, las células estrelladas se encuentran en el espacio de Disse entre los hepatocitos y las células endoteliales. Son el principal almacén de vitamina A del organismo y, como se detalla más adelante, su activación comporta una mayor producción de proteínas de matriz extracelular que contribuye de manera determinante a la fibrogenesis. Por último, las células endoteliales delimitan los sinusoides hepáticos.

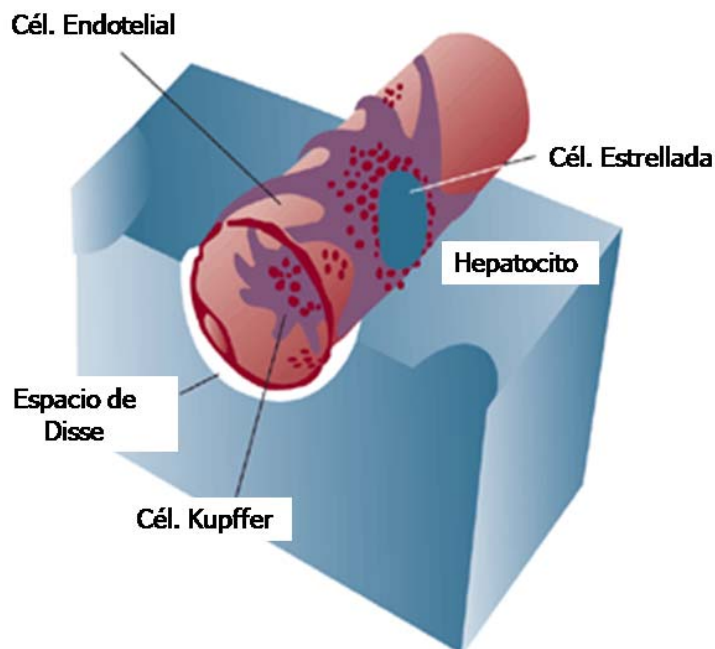


Figura 7. Estructura y tipos celulares del sinusoides hepático. Figura adaptada de Friedman, 1997.

2.- Producción hepática de eicosanoides

Los estímulos inflamatorios que inciden sobre el hígado activan las células de Kupffer, induciendo la expresión de las enzimas COX-2 y 5-LO en estos macrófagos residentes del hígado. Este proceso conduce a la producción a nivel hepático de importantes cantidades de eicosanoides con el objetivo de amplificar la señal inflamatoria y reclutar células inmunitarias

circulantes que se infiltrarán en este tejido para desarrollar la respuesta inmune y resolver esta situación potencialmente peligrosa.

A pesar de ser un mecanismo de defensa, si el proceso inflamatorio no se resuelve adecuadamente y se perpetúa en el tiempo, se da una producción excesiva de eicosanoides proinflamatorios que contribuyen al desarrollo de la enfermedad hepática crónica. De hecho, existen muchas evidencias que relacionan estrechamente la producción de eicosanoides a nivel hepático con la fisiopatología de la enfermedad hepática (Clària *et al.*, 2004).

3.- Fibrogénesis hepática

Normalmente, las células hepáticas estrelladas se hallan en un estado quiescente. No obstante, los estímulos inflamatorios provocan una serie de cambios fenotípicos complejos que comportan la activación de estas células. Las células hepáticas estrelladas activadas pierden sus gránulos de vitamina A, proliferan y se acumulan en áreas de necrosis hepatocitaria, donde producen citoquinas proinflamatorias y sintetizan una gran variedad de proteínas de matriz e inhibidores de las metaloproteasas, evitando que se degraden las proteínas de matriz. En conjunto, todos estos cambios fenotípicos en las células hepáticas estrelladas inducen la fibrogénesis y la acumulación progresiva de tejido de cicatrización alrededor de los hepatocitos con el fin de reparar los daños en el tejido.

4.- Progresión y regresión de la fibrosis hepática

Tras un daño hepático agudo, la reacción inflamatoria y el proceso de remodelación de la matriz a través de la síntesis y la degradación de fibra conducen a la recuperación de la arquitectura normal del hígado. En cambio, el daño hepático crónico se asocia a un proceso de inflamación prolongado y descontrolado, que se caracteriza por una síntesis excesiva de matriz extracelular y una degradación insuficiente de la misma. Esta situación conduce a la

acumulación progresiva de proteínas de matriz extracelular, como colágenos, proteoglicanos y glicoproteínas, que induce cambios cuantitativos y cualitativos en la composición de la matriz extracelular, en la que predominan el colágeno fibrilar tipo I y III, capaz de formar redes muy resistentes a la fibrólisis.

Tradicionalmente, se ha considerado que la fibrosis es un proceso irreversible. No obstante, varios estudios en pacientes y en ratas han demostrado que la fibrosis avanzada, incluso la cirrosis, puede revertir después de haber controlado el estímulo nocivo (Duchatelle *et al.* 1998; Dienstag *et al.*, 2003; Hammel *et al.*, 2001; Iredale *et al.*, 1998).

5.- Cirrosis hepática

El avance progresivo de la fibrosis conduce al estadio final de la enfermedad hepática crónica, denominado cirrosis. Ésta se caracteriza por la pérdida completa de la estructura normal del hígado, con la formación de septos fibróticos que envuelven los nódulos de hepatocitos en regeneración.

La cirrosis es un problema grave de salud pública en todo el mundo debido a que sus complicaciones, como la hipertensión portal, el fallo hepático y el alto riesgo de desarrollar carcinoma hepatocelular (HCC), comprometen seriamente la vida del paciente. En los países occidentales, las causas más comunes de cirrosis son el abuso de alcohol, la infección por virus C de la hepatitis, y la enfermedad hepática no alcohólica (EHNA) (Lotersztajn *et al.*, 2005).

Según las complicaciones que surgen a raíz de la cirrosis, se distinguen la cirrosis compensada y la cirrosis descompensada. En la primera, no aparecen complicaciones clínicas graves, por lo que su pronóstico es relativamente bueno. No obstante, es realmente difícil diagnosticar a estos pacientes. En la cirrosis descompensada se producen anomalías circulatorias importantes que conducen al desarrollo de hipertensión en la vena porta, que a su

vez, provoca la extravasación de líquido de los capilares hepáticos y espláncnicos que se acumula en la cavidad peritoneal formando la ascitis.

6.- Ratones tratados con tetracloruro de carbono (CCl₄)

Uno de los modelos animales más utilizados de enfermedad hepática crónica es la administración de CCl₄ en ratas (Clària *et al.*, 1999). En trabajos anteriores de nuestro grupo (Titos *et al.*, 2000; Titos *et al.*, 2002; Titos *et al.*, 2003; Titos *et al.*, 2004; Titos *et al.*, 2005; López-Parra *et al.*, 2002; López-Parra *et al.*, 2003; López-Parra *et al.*, 2005; López-Parra *et al.*, 2006; Planagumà *et al.*, 2002; Planagumà *et al.*, 2005) utilizamos el método de inhalación de CCl₄ en el interior de una cámara estanca (McLean *et al.*, 1969; López-Novoa *et al.*, 1976; López-Novoa *et al.*, 1980). La razón principal para usar este modelo es que las ratas tratadas con CCl₄ presentan muchas de las alteraciones patofisiológicas observadas en los pacientes cirróticos, entre las que destacan la fibrosis hepática, la formación de nódulos de regeneración, la hipertensión portal, la circulación portocolateral, la vasodilatación arteriolar espláncnica, la disminución de las resistencias vasculares periféricas, la hipotensión arterial, el incremento del gasto cardíaco, reactividad vascular alterada, hipervolemia, retención de sodio y agua, ascitis, hiponatremia dilucional, hipoosmolaridad, el aumento de la actividad del sistema renina angiotensina aldosterona y del sistema nervioso simpático, hipersecreción no osmótica de la hormona antidiurética, el incremento de los niveles plasmáticos del factor natriurético atrial y el aumento de la secreción urinaria de 6-keto-PGF_{1α} (Clària *et al.*, 1992; Jiménez *et al.*, 1992).

En este trabajo de tesis doctoral en lugar de usar este modelo experimental de rata, adaptamos el protocolo al ratón (Thompson *et a.*, 1998). Para ello, administramos CCl₄ por vía intraperitoneal dos veces por semana, a una dosis de 1 mL de CCl₄ por kg de peso corporal con aceite de oliva como transportador a ratones *wild-type* de la cepa 129S2/SvPasCrl.

IV.- INFLAMACIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO Y PATOLOGÍAS ASOCIADAS

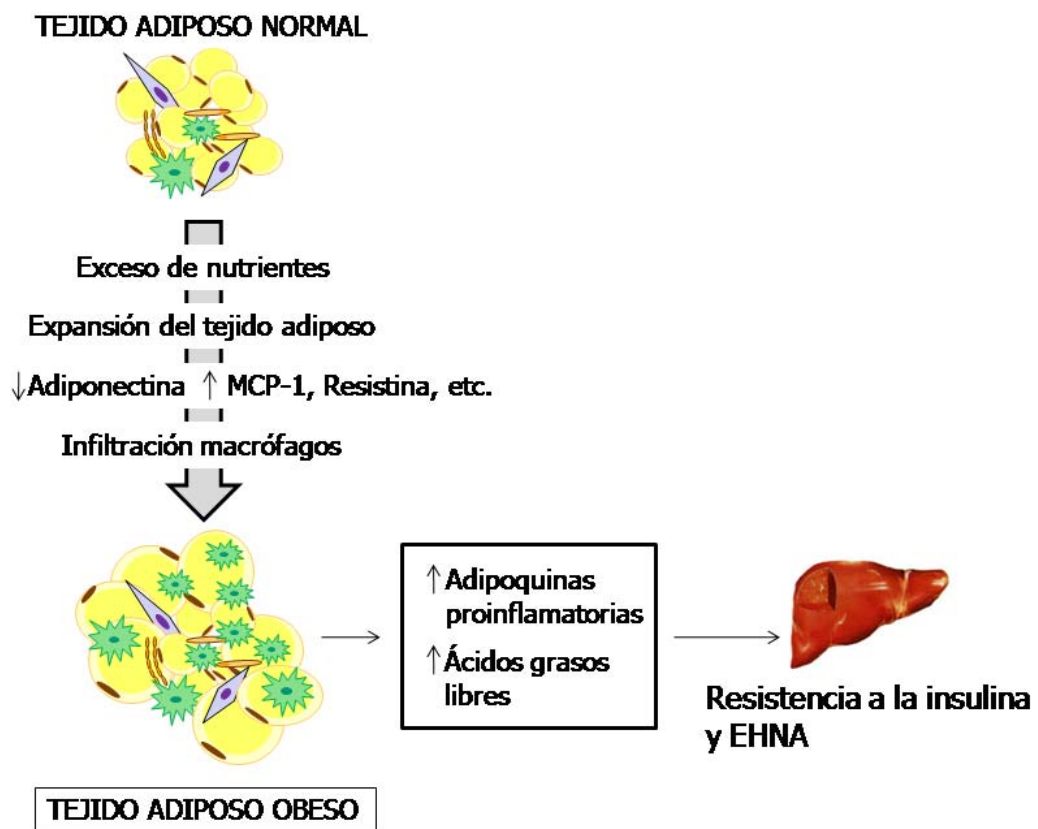
Durante muchos años, el tejido adiposo ha sido considerado un mero almacén pasivo de energía en forma de TG. Por esta razón, el estudio de su fisiología se centraba únicamente en los procesos de lipogénesis, lipólisis y sus mecanismos de regulación. No obstante, actualmente se considera que el tejido adiposo es un órgano endocrino muy activo que secreta una amplia variedad de moléculas, denominadas adipoquinas, que intervienen en la regulación del metabolismo de la glucosa y los lípidos, la homeostasis de la energía, la inmunidad y otros procesos importantes para el organismo. Leptina, adiponectina, resistina, TNF- α , IL-6, la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP)-1, PAI-1 y visfatina son algunas de las adipoquinas más importantes (Shoelson *et al.*, 2007).

Una de las consecuencias más alarmantes de los hábitos modernos en cuanto a alimentación y actividad física es el auge que ha experimentado la obesidad en los países industrializados. La obesidad está íntimamente asociada con el desarrollo de patologías graves como la EHNA, la DMT2 y las enfermedades cardiovasculares (Guilherme *et al.*, 2008; Shoelson *et al.*, 2007). De hecho, cada vez está más claro papel de leptina, adiponectina y resistina como nexos de unión entre la obesidad, la inflamación y el desarrollo de estas alteraciones metabólicas graves.

La obesidad consiste en la expansión hipertrófica e hiperplásica de los adipocitos, con infiltración de macrófagos en el tejido adiposo, que conduce al desarrollo de un estado crónico de inflamación de bajo grado a nivel sistémico (Figura 8). El exceso de nutrientes conduce a la expansión del tejido adiposo y a una producción alterada de adipoquinas, especialmente, una mayor producción de MCP-1 que favorece la infiltración de macrófagos en el tejido, y una menor producción de adiponectina, con importantes efectos antiinflamatorios y sensibilizadores a la insulina. El resultado de estas alteraciones es que el tejido adiposo obeso e inflamado libera una gran cantidad de ácidos grasos y adipoquinas proinflamatorias a la sangre que tienen

importantes efectos sobre otros órganos. Por un lado, el aumento de la concentración de ácidos grasos circulantes provoca una sobrecarga de ácidos grasos en el hígado y el músculo esquelético, que responden acumulando este exceso de lípidos en su interior. Las adipoquinas proinflamatorias también alcanzan el hígado, contribuyendo al desarrollo de la resistencia a la insulina en este tejido. Por tanto, la inflamación en el tejido adiposo, junto al exceso de ácidos grasos y adipoquinas proinflamatorias que se liberan de este tejido, son factores determinantes en el desarrollo de enfermedades metabólicas graves asociadas a la obesidad como DMT2 y EHNA (Trayhurn, 2005; Guilherme *et al.*, 2008; Shoelson *et al.*, 2007; Weisberg *et al.*, 2003).

Figura 8. Alteraciones en el tejido adiposo producidas por la obesidad y sus consecuencias hepáticas.



V.- ENFERMEDAD HEPÁTICA NO ALCOHÓLICA (EHNA)

La EHNA es un término que engloba un espectro de patologías hepáticas muy similares a las inducidas por el alcohol, pero que afectan a individuos que no abusan de esta sustancia. La EHNA es la manifestación hepática del síndrome metabólico, y se ha convertido en la mayor causa de enfermedad hepática crónica en mundo occidental. Esta enfermedad es diagnosticada a menudo por descarte cuando las pruebas diagnósticas sugieren que hay esteatosis hepática o las enzimas hepáticas están elevadas en personas obesas que no presentan ningún otro factor que cause enfermedad hepática (Clark *et al.*, 2002; Day, 2006a; Day, 2006b; Browning, 2004; Quershi *et al.*, 2007).

1.- Prevalencia de la EHNA

La EHNA afecta del 20 al 30% de la población en los países occidentales, donde ha aumentado de forma paralela a la obesidad y la DMT2, lo cual demuestra la gran importancia que tienen estas patologías en su desarrollo. Entre las personas obesas la prevalencia de la EHNA supera el 75%. Aunque solía ser una enfermedad exclusiva de adultos, actualmente la prevalencia de EHNA en niños es del 3% en general y del 23-53% en los niños obesos (Angulo, 2002; Day, 2006a; Browning, 2004). Los principales factores de riesgo para el desarrollo de la EHNA son la obesidad visceral, incluso en pacientes con un índice de masa corporal normal, la DMT2, que acentúa la severidad de esta enfermedad, y la dislipemia, concretamente, la hipertrigliceridemia más que la hipercolesterolemia. Además, se ha observado que es una enfermedad con un importante componente hereditario (Angulo, 2002).

2.- Progresión de la EHNA

La esteatosis hepática es el primer estadio de la EHNA y por tanto es la lesión más benigna en esta enfermedad. La esteatosis hepática consiste en la acumulación de TG en el interior de los hepatocitos en forma de vesículas, sin causar inflamación hepática ni muerte celular. El siguiente estadio de la enfermedad es la esteatohepatitis no alcohólica, caracterizada por la presencia de focos inflamatorios, muy ricos en neutrófilos y macrófagos, y muerte hepatocitaria, asociadas a esteatosis hepática. Después de la esteatohepatitis no alcohólica el paciente puede desarrollar fibrosis, que a su vez puede progresar hasta cirrosis.

Muchos pacientes presentan un curso bastante benigno, de manera que se mantienen en un estadio de esteatosis simple. No obstante, los pacientes que desarrollan cirrosis se enfrentan a un alto riesgo de morir por HCC o por fallo hepático (Angulo, 2002; Browning, 2004; Day, 2006a) (Ver Figura 9).

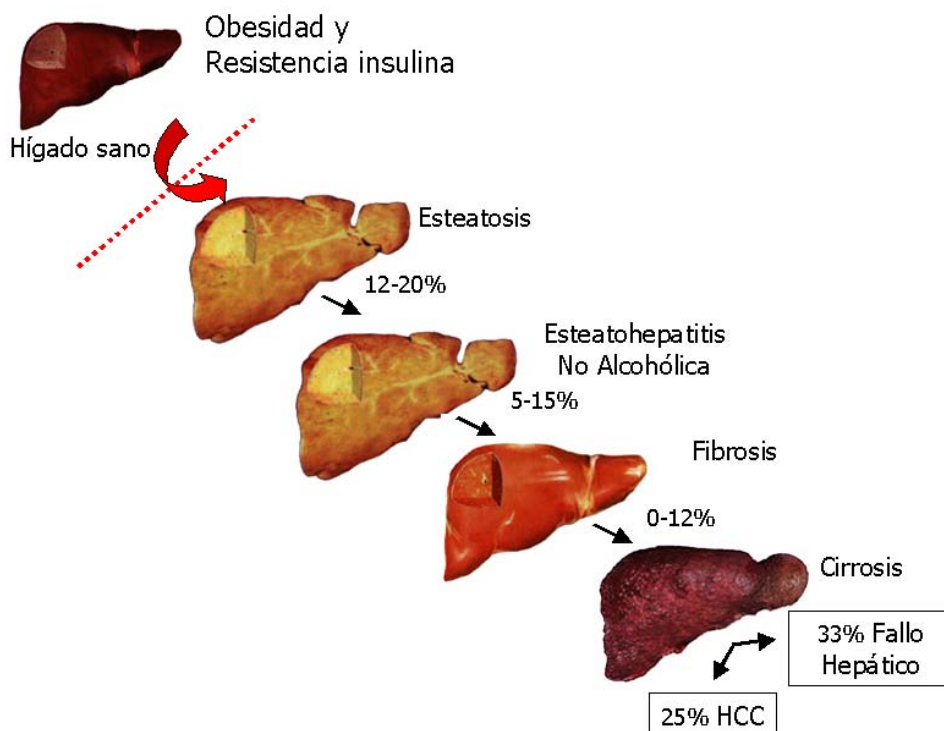


Figura 9. Historia natural de la EHNA.

En 1998 se propuso el modelo de “doble impacto” para explicar las causas de la progresión de la EHNA (Day *et al.*, 1998). Según este modelo, el primer impacto que contribuye a la progresión de la enfermedad es la esteatosis hepática, que incrementa la sensibilidad del hígado ante un segundo impacto. Los candidatos más probables de constituir el segundo impacto son aquellos eventos celulares que promueven la inflamación, la muerte hepatocitaria y la fibrosis, que son precisamente los signos histológicos característicos de la esteatohepatitis no alcohólica.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, la obesidad juega un papel clave en el desarrollo y la progresión de la EHNA. En primer lugar, el tejido adiposo obeso libera gran cantidad de ácidos grasos libres que favorecen el depósito de TG y el aumento del estrés oxidativo en el hígado, y en segundo lugar, el estado de inflamación crónica en el tejido adiposo obeso induce la producción de adipocinas proinflamatorias que llegan al hígado a través de la circulación (Browning, 2004; Day, 2006a) (Figuras 8 y 10).

2.1.- Esteatosis hepática

La obesidad provoca una serie de alteraciones moleculares y fisiológicas en el tejido adiposo que conducen al desarrollo de resistencia a la insulina y al incremento de la actividad de la enzima lipasa sensible a hormonas, que hidroliza los TG almacenados en los adipocitos hipertróficos. Esto provoca un importante aumento de los niveles de ácidos grasos libres en la sangre, que son captados por el hígado de manera proporcional a su concentración plasmática.

En una situación normal los ácidos grasos libres captados por el hígado son oxidados para producir ATP o esterificados a TG e incorporados a las VLDLs para exportar el colesterol fuera del hígado, pero cuando hay un exceso de ácidos grasos, los TG formados se almacenan en el interior del hepatocito en forma de vesículas lipídicas, dando lugar a esteatosis hepática.

Por otro lado, los altos niveles séricos de glucosa que se dan en la obesidad, aumentan la captación de esta glucosa por el hígado, donde es convertida en ácidos grasos, como mecanismo de regulación de la glucemia. Este proceso se conoce como síntesis *de novo* de ácidos grasos y se sabe que contribuye muy poco a la esteatosis hepática (Browning, 2004).

2.2.- Esteatohepatitis no alcohólica

De acuerdo con la hipótesis de los dos impactos, la esteatosis hepática es un prerrequisito para que se den los siguientes eventos que conducen al daño hepático (Figura 10). Los factores implicados en el desarrollo de la esteatohepatitis no alcohólica, inciden de manera importante en el aumento del estrés oxidativo y la producción de citoquinas proinflamatorias (Browning, 2004).

2.2.1.- Estrés oxidativo y peroxidación lipídica

Las moléculas oxidantes más abundantes en un hígado esteatótico son los radicales libres del oxígeno, los aniones superóxido y los radicales hidroxilo, que reciben el nombre de especies reactivas del oxígeno (ROS). En el hígado esteatótico, la oxidación de los ácidos grasos libres procedentes del tejido adiposo es la principal fuente de ROS, que se acumulan y dan lugar a una serie de fenómenos altamente nocivos para la célula como depleción del ATP, daño al DNA, alteraciones en la estabilidad de las proteínas, destrucción de las membranas por peroxidación lipídica y liberación de citoquinas proinflamatorias que contribuyen a la inflamación hepática.

Las ROS son moléculas de vida corta y sus efectos son principalmente locales. No obstante, al reaccionar con los PUFAs presentes en la célula, dan lugar a subproductos del aldehído, como el trans-4-hidroxi-2-nonenal (HNE) y el malondialdehído (MDA). Estas moléculas tienen vidas medias más largas y pueden difundirse hacia sitios intra y

extracelulares alejados, amplificando los efectos del estrés oxidativo. Además, estos aldehidos aumentan la producción de TNF- α , promueven el reclutamiento de células inflamatorias hacia el hígado, y activan las células hepáticas estrelladas, procesos que conducen a la muerte celular, la cronificación de la respuesta inflamatoria y la fibrosis en el hígado, respectivamente (Browning. 2004).

2.2.2.- Disfunción mitocondrial

En condiciones fisiológicas normales, la β -oxidación mitocondrial es la principal vía de oxidación de los ácidos grasos para la obtención de energía. Un rasgo característico de los pacientes con esteatohepatitis no alcohólica es la presencia de anomalías mitocondriales ultraestructurales, que se traducen en la interrupción del flujo de electrones de la cadena respiratoria y contribuyen a incrementar la producción ROS en los hepatocitos. Esto disminuye la capacidad oxidativa de las mitocondrias de manera que los ácidos grasos se acumulan en el citosol, activando las vías alternativas de oxidación en los peroxisomas (β -oxidación) y los microsomas (ω -oxidación) que incrementan todavía más los niveles de estrés oxidativo en el hígado (Browning, 2004).

2.2.3.- Inflamación

El exceso de ácidos grasos libres que llegan al hígado procedentes del tejido adiposo obeso junto a la resistencia a la insulina también contribuyen al desarrollo de la inflamación en la esteatosis, que dará paso a la aparición de esteatohepatitis no alcohólica.

La resistencia a la insulina sistémica es consecuencia de la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo durante la obesidad. Estos macrófagos liberan citoquinas, como TNF- α , IL-6 e IL-1 β , capaces de alterar la señalización de la insulina. Los ácidos grasos libres captados por el hígado activan la transcripción del factor NF- κ B, principal regulador de la

transcripción de citoquinas proinflamatorias en este órgano. La consiguiente liberación de citoquinas por parte de los hepatocitos, sobre todo TNF- α , activa las células Kupffer, que producen más citoquinas capaces de provocar daño hepatocitario por necrosis/apoptosis. Junto con el estrés oxidativo que provoca la oxidación del exceso de ácidos grasos libres, estas citoquinas también desencadenan resistencia a la insulina hepática.

Por último, la menor producción de adiponectina en el tejido adiposo obeso, con potentes acciones antiinflamatorias, es otro factor determinante para el desarrollo de la inflamación hepática en la EHNA (Day, 2006a) (Figura 10).

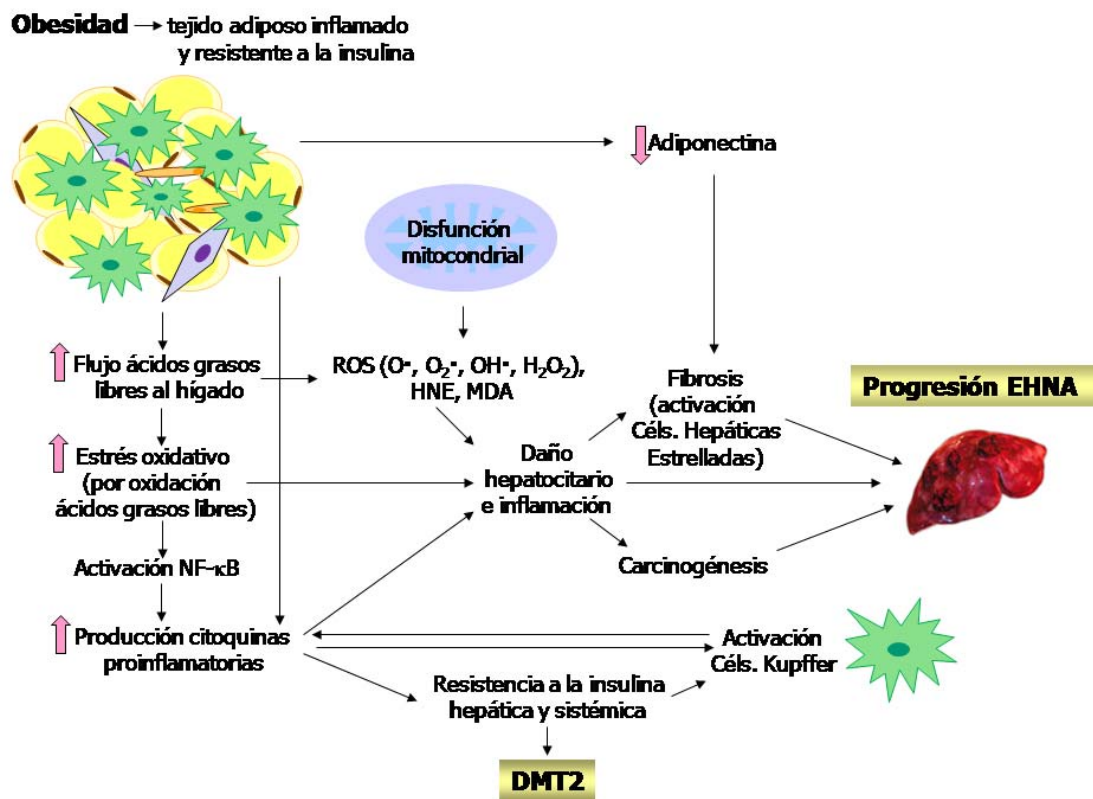


Figura 10. Papel del tejido adiposo en la patogénesis de la esteatohepatitis no alcohólica.

2.3.- Fibrosis y cirrosis hepática

Los mecanismos de estrés oxidativo, inflamación y daño hepatocitario que se producen en la esteatohepatitis no alcohólica también tienen como consecuencia la activación de las células hepáticas estrelladas (Figura 10), lo que comporta la deposición de matriz extracelular. También en este caso, la menor producción de adiponectina contribuye de manera importante al desarrollo de fibrosis (Day, 2006a).

VI.- TEJIDO ADIPOSEO

Dada la altísima prevalencia de la obesidad en los países industrializados, el tejido adiposo se ha erigido como una diana importante para la investigación biomédica con el objetivo de entender mejor los mecanismos que regulan la homeostasis de la energía y de la adiposidad del organismo para combatir la obesidad junto a sus graves complicaciones de manera efectiva.

1.-Tejido adiposo marrón (TAM) y tejido adiposo blanco (TAB)

A tenor de las características bioquímicas y funcionales del tejido adiposo se distinguen el TAM y del TAB.

1.1.- Características del TAM

El TAM está especializado en la termogénesis sin temblor, un mecanismo de adaptación al frío importante para muchos homeotermos, como animales hibernantes, o aquéllos cuya relación entre su masa corporal (generación de calor) y su área superficial (pérdida de calor) es pequeña, como roedores. Los niños recién nacidos también presentan un TAM bien desarrollado en la zona de la nuca y en la espalda. Durante el desarrollo postnatal, los adipocitos marrones se transforman progresivamente en adipocitos blancos, por lo que la distribución del TAM se reduce considerablemente, hasta el punto que en los adultos la presencia de TAM funcional es

casi inexistente. No obstante, en todos los depósitos de TAB pueden detectarse adipocitos marrones en cantidades variables, dependiendo de la especie, la localización y la temperatura ambiental.

El color marrón que caracteriza al TAM se debe a la presencia de un gran número de mitocondrias en el citoplasma de los adipocitos. Además, estas células presentan un gran número de pequeñas gotas de TG, que junto al elevado número de mitocondrias, permiten una movilización muy rápida de la energía para la producción calor.

La principal peculiaridad del TAM está en sus mitocondrias, ya que en este tejido el gradiente de protones de la cadena respiratoria se puede desacoplar de la generación de ATP gracias a la expresión de la proteína desacopladora (UCP)-1. Esto permite destinar la energía obtenida de la oxidación de los ácidos grasos a la producción de calor, en vez de quedar retenida en forma de ATP (Guilherme *et al.*, 2008).

El TAM no produce calor continuamente, sino que el sistema nervioso simpático activa el proceso de termogénesis. Tras la activación se produce un incremento de la hidrólisis de los TG almacenados en los adipocitos marrones, una mayor oxidación de los ácidos grasos, y un aumento del flujo sanguíneo a través de la extensa vascularización presente en el TAM. De este modo, la sangre se calienta y transporta el calor del TAM al resto del cuerpo.

1.2.- Características del TAB

El TAB representa la mayor reserva de energía a largo plazo del organismo, ya que es el principal lugar de almacenaje en forma de TG del exceso de energía derivado de la comida. La acumulación de TG es un proceso bioquímico altamente eficiente ya que debido a la extrema hidrofobia de los TG, se almacena gran cantidad de energía por unidad de peso.

Los adipocitos blancos almacenan los TG en una única gran gota lipídica que ocupa prácticamente la totalidad de su citoplasma. En situaciones que requieren gasto de energía, los

TG son rápidamente hidrolizados por lipasas en un proceso denominado lipólisis, y los ácidos grasos obtenidos son transportados por la sangre hacia otros tejidos donde serán oxidados en las mitocondrias como fuente de energía (Guilherme *et al.*, 2008).

Una concentración excesivamente alta de ácidos grasos libres en el plasma tiene consecuencias muy adversas para la salud. Por este motivo, el papel regulador del TAB es esencial para la coordinación del metabolismo de los lípidos y la glucosa y la salud del organismo.

Normalmente el TAB supone del 10 al 20% del peso corporal en los hombres y del 20 al 30% en las mujeres, lo que garantiza la reserva energética para dos meses. No obstante, el contenido del TAB es altamente variable a lo largo de la vida del individuo en función de multitud de factores. Tanto es así que el TAB es el único órgano con un potencial ilimitado de crecimiento a cualquier edad del individuo. El crecimiento del TAB puede ser de tipo hipertrófico y reversible, por aumento de la cantidad de TG almacenados en los adipocitos, o hiperplásico e irreversible, por aumento del número de adipocitos.

En las personas adultas, prácticamente todo el tejido adiposo es blanco, por tanto, al hablar de tejido adiposo se está haciendo referencia al TAB.

2.- Clasificación del TAB:

Teniendo en cuenta la localización de los depósitos de tejido adiposo y las características funcionales de los adipocitos que los integran, el TAB se subdivide, a grandes rasgos, en subcutáneo y visceral. El primero comprende la grasa ubicada entre la dermis y los músculos, mientras que el visceral está integrado por todo el tejido adiposo intraperitoneal.

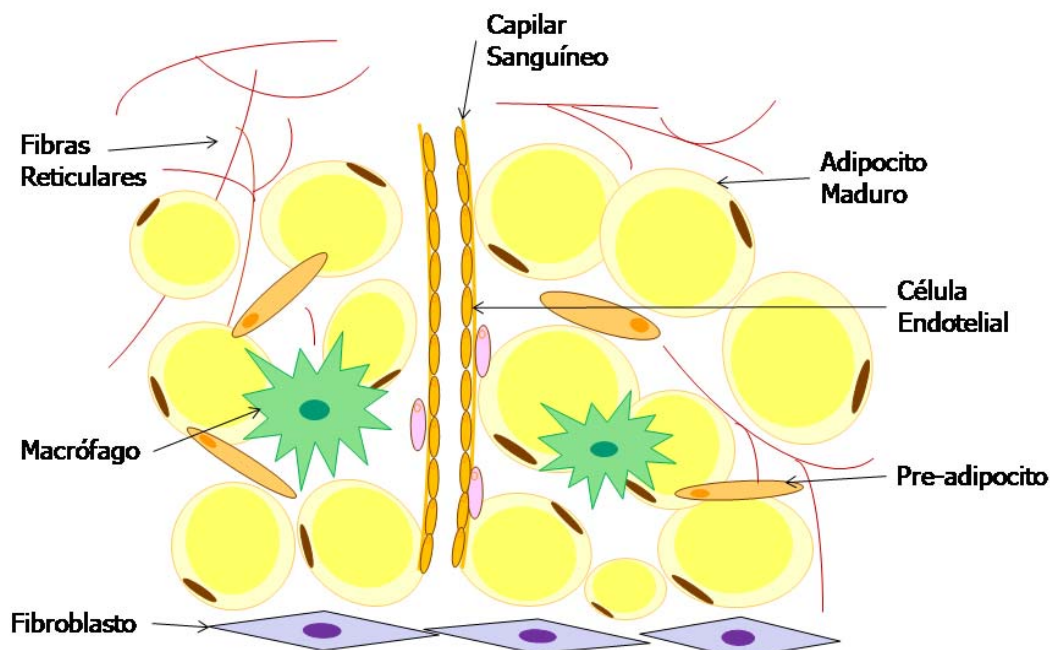
Hace más de 60 años se observó que la adiposidad visceral se correlaciona con el desarrollo de desórdenes metabólicos graves, como la EHNA y el síndrome metabólico. Hoy se sabe que la principal diferencia entre el tejido adiposo subcutáneo y el visceral radica en la secreción de

adipoquinas. De hecho, se ha demostrado que los niveles de citoquinas proinflamatorias están aumentados en pacientes con mayor adiposidad visceral. Esto explica por qué el aumento del tejido adiposo visceral y no de subcutáneo, se asocia con estos desórdenes metabólicos (Schäffler *et al.*, 2005).

3.- Estructura del TAB:

El tejido adiposo presenta una estructura laxa y desordenada, donde los adipocitos se sostienen mediante fibras reticulares formando lóbulos unidos por septos fibrosos de tejido conectivo, rodeados de una red capilar y nerviosa muy rica. Los adipocitos representan aproximadamente el 70% de la masa adiposa total en los adultos, pero sólo el 25% de la población celular. El 75% restante de las células que integran el tejido adiposo son macrófagos, fibroblastos, células sanguíneas, células endoteliales y pre-adipocitos, que forman parte de la fracción estromal vascular (Frühbeck, 2008) (Figura 11).

Figura 11. Estructura del tejido adiposo.



3.1.- Adipocitos

Los adipocitos son células esféricas de tamaño y volumen altamente variables de 20 a 200 μm de diámetro y de pocos pL hasta 3 nL de volumen, típicamente uniloculares. A pesar de ello durante un breve periodo de tiempo, en su desarrollo, el citoplasma suele albergar múltiples gotas lipídicas que acaban fundiéndose en una única gota de gran tamaño que ocupa prácticamente todo el interior celular. El núcleo celular también cambia a medida que los adipocitos maduran, en los adipocitos jóvenes el núcleo es redondo, mientras que en los adipocitos maduros, con un 90% de su volumen ocupado por la vacuola lipídica, el núcleo queda aplastado en la periferia de la célula, adquiriendo forma de media luna. La gota lipídica está separada de la matriz citoplasmática por una fina membrana. El citoplasma queda reducido a una vaina estrecha que se extiende alrededor de la vacuola lipídica.

Este tipo celular está especializado en la captación de ácidos grasos libres circulantes, su esterificación en TG y su almacenaje hasta que el organismo se enfrenta a una situación de balance energético negativo, como el ayuno o el ejercicio intenso. En estas situaciones, los TG son hidrolizados liberando ácidos grasos por un proceso conocido como lipólisis. A pesar de que los TG almacenados en los adipocitos son la principal reserva de energía del organismo, los procesos de esterificación de los ácidos grasos e hidrólisis de TG tienen lugar de manera continua, por lo que los lípidos están en constante transformación. Casi un 95% de los lípidos almacenados en los adipocitos son TG formados principalmente por ácido oleico (18:1n-9) y ácido palmítico (16:0), el resto de lípidos que contienen los adipocitos son ácidos grasos libres, diglicéridos, fosfolípidos y colesterol.

Además, los adipocitos tienen una función endocrina muy importante que llevan a cabo mediante la producción de adipoquinas. Dada su importancia para la regulación del metabolismo energético del organismo y su implicación en el desarrollo de alteraciones asociadas a la obesidad, las adipoquinas se explican detalladamente en el *apartado VI.4*.

3.2.- Células estromales vasculares

Son todas aquellas células del tejido adiposo que no son adipocitos maduros, como fibroblastos, macrófagos, células endoteliales, células musculares lisas y pre-adipocitos (Figura 11). Algunas de estas células también secretan varias adipoquinas, principalmente proinflamatorias.

4.- Adipoquinas

Como ya se ha comentado en el *apartado IV*, el tejido adiposo produce y libera a la sangre una gran variedad de moléculas, denominadas genéricamente adipoquinas, entre las que se han identificado más de cien hormonas, factores de crecimiento, citoquinas, factores del complemento y proteínas de la matriz (Figura 12). Algunas adipoquinas son generadas exclusivamente por los adipocitos, como la adiponectina, la leptina y la resistina. En cambio otras, como TNF- α , IL-6, IL-1 β , MCP-1 y el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI)-1, también son producidas por las células estromales vasculares y otros tipos celulares. Los adipocitos expresan receptores para la mayoría de las adipoquinas, lo que garantiza la comunicación local y sistémica frente a estímulos externos específicos.

Las adipoquinas exclusivas del tejido adiposo se comportan como hormonas, circulan en la sangre y desempeñan funciones importantes en el metabolismo y el sistema inmunitario (Guilherme *et al.*, 2008).

¿Adipoquinas o adipocitoquinas?

El primer término acuñado para englobar a todas las proteínas secretadas por tejido adiposo fue "adipocitoquinas". Más tarde, este término se desechó porque, en un sentido estricto del término, no todas las proteínas secretadas por el tejido adiposo son citoquinas. El nombre alternativo que se propuso fue "adipoquinas", que no implica pertenencia a ningún grupo funcional y permite englobar a todas las proteínas producidas por el tejido adiposo.

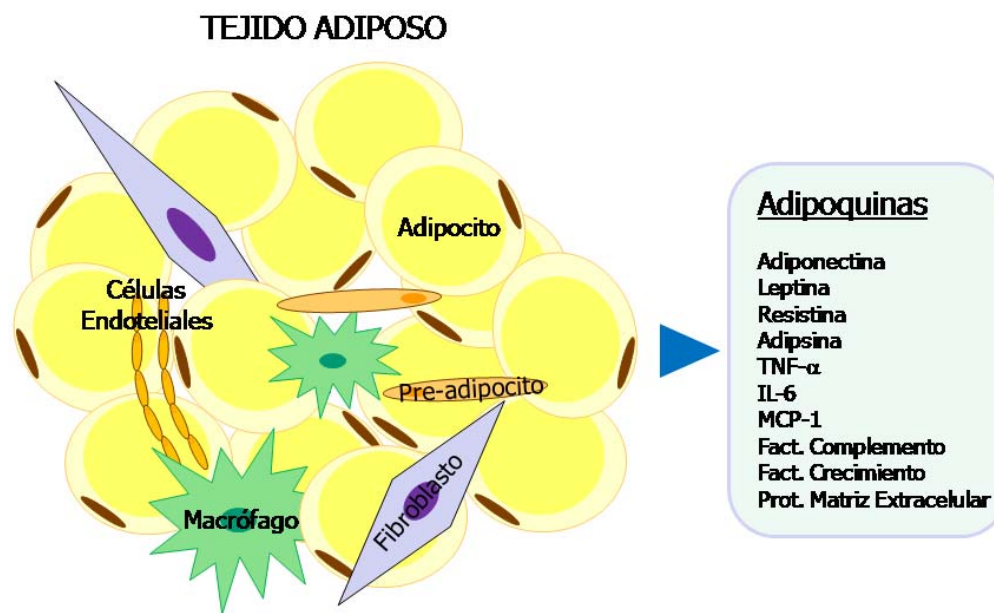


Figura 12. Adipoquinas producidas por el tejido adiposo.

Se ha observado que la producción de adipoquinas está alterada en la obesidad. Este hecho es un indicativo de la importancia que tienen estos productos del tejido adiposo en el desarrollo de la obesidad y sus complicaciones asociadas, como la resistencia a la insulina y la EHNA (Schäffler *et al.*, 2005; Shoelson *et al.*, 2007). Por este motivo, en los últimos años las adipoquinas han suscitado un enorme interés que las ha convertido en objeto de numerosos estudios. Los resultados obtenidos apuntan que estas moléculas podrían ser de gran utilidad en el desarrollo de nuevas terapias para la obesidad y sus complicaciones.

A continuación se explican las principales adipoquinas producidas exclusivamente en el tejido adiposo.

4.1.- Adiponectina

La adiponectina fue descubierta en 1995 (Scherer *et al.*, 1995). Es una proteína de 247 aminoácidos con una región de tipo colágeno en su extremo N-terminal, muy importante para la formación de estructuras secundarias, y un dominio globular en su extremo C-terminal,

responsable de la mediación de los efectos biológicos de la adiponectina. Los monómeros de adiponectina oligomerizan en trímeros mediante puentes disulfuro entre los dominios de tipo colágeno, formando la que se conoce como adiponectina de bajo peso molecular. También se han encontrado estructuras hexaméricas, denominadas adiponectina de medio peso molecular e incluso polímeros de 12-18 monómeros, conocidos como adiponectina de alto peso molecular (Figura 13). Estas formas de mayor tamaño son las más abundantes en el suero humano, y aunque la adiponectina de bajo peso molecular es la forma más activa, se ha observado que las formas superiores son esenciales para determinados efectos biológicos de la adiponectina. La adiponectina es la adipoquina que presenta mayores niveles séricos (5-10 mg/mL) (Tilg *et al.*, 2006; Koerner *et al.*, 2005).

Además de formar trímeros, hexámeros y estructuras superiores, la adiponectina puede ser fragmentada por una elastasa que secretan los monocitos y neutrófilos activados, originando fragmentos proteolíticos que sólo contienen el dominio globular. Esta forma se conoce como adiponectina globular y puede formar trímeros, pero no formas mayores (Figura 13).

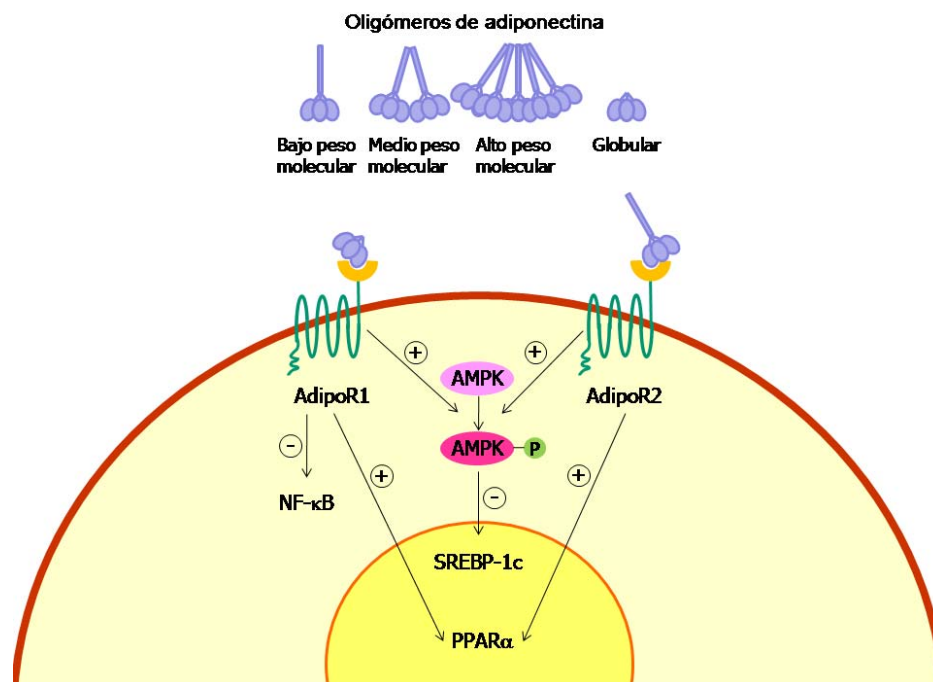


Figura 13. Estructuras y receptores de la adiponectina.

Se han identificado dos receptores para la adiponectina, denominados ADIPOR1 y ADIPOR2 (Tilg *et al.*, 2006). ADIPOR1 se expresa casi ubicuamente y es activado por la adiponectina globular. En cambio, ADIPOR2 se expresa principalmente en el hígado y es activado por la adiponectina de bajo peso molecular (Figura 13). A pesar de estas diferencias, la activación de ambos receptores da lugar a las mismas acciones (Tsochatzis *et al.*, 2006).

La adiponectina es diferente al resto de adipoquinas en cuanto a propiedades biológicas, ya que desempeña importantes acciones antiinflamatorias, antifibróticas, sensibilizadoras a la insulina y antiesteatóticas en ratones y en humanos (Tilg *et al.*, 2006; Schäffler *et al.*, 2005). Es la única adipoquina cuyos niveles disminuyen con la obesidad. Los estudios llevados a cabo en animales obesos tratados con adiponectina han demostrado que esta adipoquina disminuye la hiperglicemia y mejora la sensibilidad a la insulina (Tilg *et al.*, 2006). En el hígado, la adiponectina tiene efectos beneficiosos en la EHNA, ya que disminuye la esteatosis y atenúa la fibrogénesis (Xu *et al.*, 2003; Kamada *et al.*, 2003; Masaki *et al.*, 2004). Estas observaciones convierten a la adiponectina en la adipoquina con el mayor potencial en cuanto al tratamiento de la obesidad y enfermedades relacionadas.

Mecanismos sensibilizadores a la insulina

Los efectos sensibilizadores a la insulina llevados a cabo por la adiponectina se deben principalmente a su acción mediada por receptor sobre la quinasa activada por AMPc (Figura 13), más conocida como AMPK, una proteína heterotrimérica formada por una subunidad α , otra β y otra γ , que funciona como sensor de la energía del organismo y es responsable del mantenimiento de su equilibrio, regulando la homeostasis de la glucosa y los lípidos en el tejido adiposo, el hígado y el músculo. AMPK responde a los cambios en el estado energético de la célula, activándose por fosforilación de la subunidad α cuando los niveles de AMPc están altos, signo de que las reservas de energía de la célula están bajas. Entonces, AMPK restablece los niveles de energía inhibiendo vías metabólicas que consumen ATP y activando aquéllas que

producen ATP (Long *et al.*, 2006; Browning, 2004). A través de AMPK, la adiponectina favorece la translocación del transportador de glucosa en varios tejidos, regulando la hiperglucemia.

También es importante resaltar que los fármacos antidiabéticos denominados glitazonas, que activan el receptor nuclear de hormonas PPAR γ , aumentan significativamente los niveles circulantes de adiponectina (Tilg *et al.*, 2006; Browning, 2004).

Mecanismos antiesteatóticos

El hígado expresa grandes cantidades de ADIPOR2. La activación de AMPK a través de este receptor estimula la β -oxidación en los hepatocitos y disminuye la expresión de la proteína de unión al elemento de respuesta a los esteroides (SREBP)-1c, que es el principal factor de transcripción que controla la expresión de genes lipogénicos (Figura 13). Por esta misma vía, la adiponectina inhibe la expresión del gen acetil-CoA carboxilasa, que participa en la lipogénesis.

Además, a través de su unión a receptor, la adiponectina activa el receptor nuclear PPAR α , activando la β -oxidación a nivel hepático (Tilg *et al.*, 2006).

Mecanismos antiinflamatorios

La adiponectina suprime la síntesis de varias citoquinas proinflamatorias, como TNF- α , e IFN γ y aumenta la de citoquinas antiinflamatorias como IL-10. Este efecto se debe a la inhibición que ejerce la adiponectina sobre la activación del factor NF- κ B, principal regulador de la transcripción de citoquinas proinflamatorias (Figura 13), (Tilg *et al.*, 2006).

Mecanismos antifibrogénicos

Dado que las células hepáticas estrelladas expresan tanto ADIPOR1, como ADIPOR2, la adiponectina actúa sobre estas células inhibiendo su proliferación y migración, así como la expresión del factor de crecimiento transformante (TGF)- β 1, el principal activador de la síntesis de proteínas de matriz extracelular (Schäffler *et al.*, 2005).

4.2- Leptina

La leptina fue descubierta en 1994 (Zhang *et al.*, 1994) y su hallazgo supuso la revolución conceptual del tejido adiposo. Es una proteína de 160 aminoácidos producida por los adipocitos.

Se han descrito formas largas, cortas y solubles del receptor de la leptina, aunque todas ellas provienen del mismo gen y se forman por splicing alternativo. Los receptores de la leptina se expresan de manera ubicua, aunque la forma larga (OB-Rb) ha sido identificada como la isoforma responsable de los efectos biológicos de la leptina (Koerner *et al.*, 2005; Tsochatzis *et al.*, 2006).

Por un lado, la leptina actúa como señal de saciedad, regulando el apetito, el metabolismo energético del organismo y las células β del páncreas. Por otro lado, está considerada una adipocina proinflamatoria, ya que presenta similitudes estructurales con algunas citoquinas proinflamatorias, como IL-6 e IL-12 (Tilg *et al.*, 2006). De hecho se ha demostrado que la expresión de leptina está incrementada en condiciones asociadas con la liberación de citoquinas proinflamatorias, como la sepsis. La leptina también es capaz de activar AMPK, desempeñando importantes acciones antiesteatóticas, al inhibir SREBP-1c, y aumentar los niveles de PPAR α (ver apartado VI.4.1.2). También es un potente factor profibrogénico, ya que actúan sobre las células hepáticas estralladas, que expresan receptores para la leptina, promoviendo su proliferación, inhibiendo la apoptosis y estimulando la producción de proteínas de matriz extracelular (Schäffler *et al.*, 2005; Qureshi *et al.*, 2007). Los niveles séricos de leptina son un reflejo directo de la cantidad de energía almacenada en el tejido adiposo (Tilg *et al.*, 2006).

Los marcados efectos de la leptina en la homeostasis de la energía alentaron las esperanzas de encontrar tratamientos efectivos para la obesidad. Paradójicamente, la mayoría de personas obesas suelen presentar niveles circulantes de leptina muy elevados, lo que apunta que la obesidad provoca un estado de resistencia a la leptina. Esto explicaría la inhibición de los

efectos anorexigénicos y antiesteatóticos de esta adipoquina en las personas obesas (Koerner *et al.*, 2005; Qureshi *et al.*, 2007).

4.2.1.- Ratones *ob/ob* deficientes en leptina

El modelo animal usado en esta tesis doctoral para estudiar el papel de la obesidad en la aparición de complicaciones hepáticas se conoce como ratón *ob/ob*. Esta cepa de ratones es un modelo de obesidad genética, descubierto en 1949 en los laboratorios Jackson como consecuencia de una mutación autosómica recesiva espontánea. El ratón homocigoto para la mutación presenta un fenotipo muy característico, en el que destaca la obesidad, pudiendo alcanzar un peso 3 veces superior al de un ratón *wild-type*, esteatosis hepática severa, resistencia a la insulina, niveles séricos elevados de colesterol (HDL, LDL y VLDL), glucosa e insulina. Además, los individuos homocigotos para la mutación son infértiles. Este fenotipo se debe a la ausencia de expresión de la leptina, a causa de una mutación en el codón 105 del gen *Ob*, que codifica la leptina, que convierte el aminoácido codificado por este codón en un codón STOP, lo que inactiva la proteína, pero no su RNAm. Sorprendentemente, en el tejido adiposo de estos ratones los niveles de RNAm de la leptina son hasta 20 superiores a los de un ratón normal, a pesar de que la proteína no es detectable en su suero.

4.3.- Resistina

La resistina humana es una proteína de 108 aminoácidos perteneciente a la familia de las proteínas pequeñas de secreción ricas en cisteína denominada “proteínas halladas en zonas de inflamación” (FIZZ) o “moléculas tipo resistina” (RELMS) (Bertolani *et al.*, 2008). La proteína homóloga de la resistina en ratón presenta 114 aminoácidos. Fue descubierta por tres grupos independientes entre los años 2000 y 2001 (Holcomb *et al.*, 2000; Stepan *et al.*, 2001; Kim *et*

al., 2001) que la identificaron, respectivamente, como una diana de la glitazonas, los fármacos antidiabéticos más extendidos, un producto secretado por el tejido adiposo de ratón y una molécula homóloga de proteínas proinflamatorias. Aunque se están llevando a cabo varios estudios, el receptor de la resistina todavía no se ha descrito.

Mientras que en ratones, la expresión de la resistina está restringida a los adipocitos maduros, en humanos, esta adipocina se expresa en varios tejidos, siendo los macrófagos son la principal fuente de resistina (Bertolani *et al.*, 2008).

Se han encontrado numerosas evidencias que le atribuyen un marcado perfil proinflamatorio. Por ejemplo, se ha observado que los niveles de resistina se correlacionan con los niveles de IL-6 en personas (Qureshi *et al.*, 2007; Bertolani *et al.*, 2008). Además, se ha observado una correlación entre los niveles plasmáticos de resistina y un estado inflamatorio. En voluntarios humanos, la inducción de endotoxemia, además de provocar resistencia a la insulina, causa un aumento muy marcado de los niveles circulantes de resistina (Bertolani *et al.*, 2008).

Además, se ha observado que la resistina aumenta la expresión de TNF- α e IL-6 en los macrófagos humanos. Esta adipocina se acumula en las articulaciones de los pacientes con artritis reumatoide y sus niveles se correlacionan con marcadores de inflamación. La resistina humana provoca la expresión de citoquinas inflamatorias como TNF- α , MCP-1, IL-1, IL-6, IL-8 e IL-12 en varios tipos celulares a través de la activación de NF- κ B, entre los que destacan las células hepáticas estrelladas activadas en cultivo (Tilg *et al.*, 2006; Bertolani *et al.*, 2008).

La resistina se ha relacionado con la patogénesis de la resistencia a la insulina asociada a la obesidad y la DMT2 en modelos experimentales de ratón. A pesar de que todavía no se ha establecido con claridad qué función desempeña realmente la resistina humana, sus propiedades proinflamatorias indican que puede jugar un papel importante en los procesos de inflamación, más que en la homeostasis de la glucosa. Por tanto, podría participar en el estado

de inflamación de grado bajo asociado a la obesidad, puesto que ésta se caracteriza por la infiltración de macrófagos, principales responsables de la secreción de resistina en humanos, en el tejido adiposo (Tilg *et al.*, 2006, Bertolani *et al.*, 2008; Koerner *et al.*, 2005).

Objetivos

Dado que tanto la enfermedad hepática crónica como la obesidad y las complicaciones hepáticas asociadas a ésta presentan un componente inflamatorio clave para su desarrollo, y teniendo en cuenta los efectos beneficiosos de los ácidos grasos omega-3 demostrados en múltiples patologías clínicas de índole inflamatoria (Calder, 2002), los objetivos del presente trabajo fueron:

Objetivo 1: Investigar los efectos de los ácidos grasos omega-3 en la inflamación hepática crónica.

Este objetivo se alcanzó a través de los siguientes estudios:

- 1.1.- Investigar los efectos hepatoprotectores de los omega-3 sobre el daño genotóxico y el estrés oxidativo *in vitro*.
- 1.2.- Investigar los efectos de los ácidos grasos omega-3 sobre la necroinflamación hepática inducida por CCl₄ en ratón.
- 1.3.- Monitorizar de la generación de mediadores lipídicos bioactivos derivados de los ácidos grasos omega-3 en el hígado.
- 1.4.- Investigar los efectos biológicos de los mediadores lipídicos bioactivos de los ácidos grasos omega-3 en eventos determinantes para la patogénesis de la necroinflamación hepática.

Objetivo 2: Investigar los efectos de los ácidos grasos omega-3 sobre el tejido adiposo y las complicaciones hepáticas asociadas a la obesidad.

Este objetivo se alcanzó a través de los siguientes estudios:

- 2.1.- Explorar los efectos de los ácidos grasos omega-3 sobre la esteatosis hepática *in vivo*.

2.2.- Investigar los efectos de los ácidos grasos omega-3 sobre la expresión de adipoquinas *in vivo*.

2.3.- Investigar los efectos sensibilizadores a la insulina de los ácidos grasos omega-3.

2.4.- Caracterizar, mediante análisis lipidómico, el perfil de eicosanoides y mediadores lipídicos bioactivos derivados de los ácidos grasos omega-3, resolvinas y protectinas.

2.5.- Investigar la posible contribución de RvE1 y PD1 en los efectos observados con los ácidos grasos omega-3 sobre la esteatosis hepática y la resistencia a la insulina.

Resultados

I.- ARTÍCULO 1

El DHA atenúa el daño hepático a través de su conversión a mediadores lipídicos protectores: potectina D1 y 17S-HDHA.

1.- El DHA redujo de manera significativa el daño en el DNA inducido por el peróxido de hidrógeno y el estrés oxidativo en hepatocitos CC-1 cultivados.

Para probar *in vitro* los potenciales efectos protectores de los ácidos grasos omega-3, se trataron hepatocitos en cultivo con DHA. Se evaluó el daño en el DNA, que es uno de los primeros eventos en la iniciación y la progresión del daño hepático, mediante la técnica conocida como "ensayo cometa". El resultado fue que DHA redujo de manera significativa la longitud de las colas de los "cometas", parámetro directamente relacionado con el grado de rotura sufrido por el DNA tras inducir el daño genotóxico con peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Además, el estrés oxidativo, determinado por la cuantificación de los niveles de MDA medidos mediante HPLC, también se redujo significativamente en los hepatocitos tratados con DHA.

2.- Las dietas enriquecidas con ácidos grasos omega-3 mejoraron la necroinflamación inducida mediante CCl₄ en ratones.

Con el fin de reproducir las observaciones *in vitro* en un modelo *in vivo*, se administraron dietas enriquecidas con ácidos grasos omega-3 en un modelo experimental de daño hepático crónico inducido con CCl₄ en ratones y se comparó la necroinflamación hepática que presentaban estos ratones con la de sus controles tratados con CCl₄ y una dieta control. Después de cinco semanas de tratamiento, los animales control mostraban necrosis hepatocitaria, inflamación y degeneración hidrópica severas en las zonas centrolobulillares con necrosis en puente, que alteraba de manera notable la arquitectura sinusoidal y lobulillar.

En los ratones alimentados con las dietas enriquecidas con los ácidos grasos DHA y DHA+EPA se observó una mejora considerable en la patología hepática. De hecho, los índices de necroinflamación hepática eran significativamente menores en los animales que recibieron las dietas enriquecidas con ácidos grasos omega-3 en comparación con los que recibieron la dieta control. Además, la dieta enriquecida con DHA+EPA redujo la degeneración hidrópica de los hepatocitos.

3.- La expresión de COX-2 y los niveles de PGE₂ se redujeron de manera significativa en el hígado de ratones alimentados con dietas enriquecidas con ácidos grasos omega-3.

Se analizaron los niveles de expresión de COX-2 mediante PCR a tiempo real, y la formación de PGE₂ por inmunoensayo enzimático. La administración de las dietas enriquecidas con ácidos grasos omega-3 disminuyó significativamente la expresión del RNAm de COX-2 en el hígado. De acuerdo con este resultado, los niveles hepáticos de PGE₂ se redujeron significativamente en los grupos que recibieron DHA y DHA+EPA.

4.- La formación hepática de 17S-HDHA y PD1, mediadores lipídicos derivados del DHA, aumentó en los animales alimentados con las dietas ricas en ácidos grasos omega-3.

También analizamos mediante HPLC-GC/MS la formación hepática de mediadores derivados del DHA, con potentes efectos antiinflamatorios y de resolución, en los ratones alimentados con una dieta enriquecida con ácidos grasos omega-3. Concretamente, se identificaron PD1 y 17S-HDHA, marcador de la activación de la vía de síntesis de PD1 y precursor metabólico de resolvinas de la serie D, en las muestras de hígado de los ratones alimentados con DHA, pero no en los ratones que recibieron la dieta control.

5.- El derivado sintético de DHA, 17-HDHA, redujo considerablemente el daño genotóxico y oxidativo en hepatocitos cultivados y disminuyó la liberación de TNF- α en la línea de macrófagos Raw 264.7.

Quisimos analizar si los mediadores lipídicos derivados del DHA eran capaces de mediar los efectos hepatoprotectores observados previamente con las dietas enriquecidas con ácidos grasos omega-3. Con este fin, tratamos hepatocitos de la línea CC-1 y macrófagos de la línea 264.7 con 17-HDHA. El resultado de estos experimentos fue que 17-HDHA redujo de manera significativa el daño genotóxico y los niveles de estrés oxidativo en los hepatocitos, igual que se había observado con el DHA. Además, 17-HDHA también inhibió la liberación de TNF- α en los macrófagos.

6.- 17-HDHA demostró ser un agonista de PPAR γ de modo concentración-dependiente.

Dado que PPAR γ ejerce acciones antiinflamatorias y antifibrogénicas en el hígado, el siguiente paso en el estudio fue explorar si 17-HDHA y otros derivados del DHA (7-HDHA, 14-HDHA y 17R-HDHA) activaban este receptor nuclear. A través de un ensayo de transactivación (ver apartado IV.4 de la sección de Materiales y Métodos) observamos que el compuesto 17-HDHA se comportó como un potente agonista de PPAR γ , de manera dependiente de concentración. Además, se observó que la activación de PPAR γ era un efecto estereoselectivo, puesto que el isómero 17R-HDHA no fue capaz de activar este receptor nuclear. Por otro lado, mientras que 14-HDHA no mostró actividad en este ensayo, 7-HDHA también se comportó como un potente agonista de PPAR γ , de manera parecida a 17-HDHA.

7.- DHA moduló la expresión de la proteína 5-LO en macrófagos de la línea Raw 264.7 y redujo la producción hepática de LTB $_4$.

Para poder caracterizar los mecanismos subyacentes a los efectos hepatoprotectores de los ácidos grasos omega-3, se evaluó el efecto de DHA y 17-HDHA sobre la vía proinflamatoria de la 5-LO. Por un lado, la determinación de los niveles de LTB₄ mediante HPLC reveló que la producción de este importante efector del daño hepatocelular era menor en los hígados de los ratones que recibieron la dieta enriquecida con DHA en comparación con los ratones alimentados con la dieta control. Además, DHA y 17-HDHA redujeron la expresión de 5-LO en macrófagos Raw 264.7, analizada mediante Western blot.

Docosahexaenoic acid (DHA) blunts liver injury by conversion to protective lipid mediators: protectin D1 and 17S-hydroxy-DHA

Ana González-Pérez,* Anna Planagumà,* Karsten Gronert,[†] Rosa Miquel,[‡] Marta López-Parra,* Esther Titos,* Raquel Horrillo,* Natàlia Ferré,* Ramon Deulofeu,* Vicente Arroyo,[§] Juan Rodés,[§] and Joan Clària*¹

*Department of Biochemistry and Molecular Genetics, [†]Pathology Laboratory and [§]Liver Unit, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona School of Medicine, Barcelona, Spain; and [‡]Department of Pharmacology, New York Medical College, Valhalla, New York, USA

ABSTRACT Docosahexaenoic acid (DHA) is a ω -3 essential fatty acid that reduces the incidence and severity of a number of diseases. Recently, a novel series of DHA-derived lipid mediators with potent protective actions has been identified. In this study we demonstrate that dietary amplification of these DHA-derived products protects the liver from necroinflammatory injury. *In vitro*, supplementation of hepatocytes with DHA significantly reduced hydrogen peroxide-induced DNA damage, evaluated by the “comet assay,” and oxidative stress, determined by measurement of malondialdehyde levels. *In vivo*, dietary supplementation of mice with DHA ameliorated carbon tetrachloride-induced necroinflammatory damage. In addition, hepatic cyclooxygenase-2 expression and PGE₂ levels were significantly reduced in mice fed DHA-enriched diets. In these animals, increased hepatic formation of DHA-derived lipid mediators (*i.e.*, 17S-hydroxy-DHA (17S-HDHA) and protectin D1) was detected by HPLC-gas chromatography/mass spectrometry analysis. Consistent with these findings, synthetic 17-HDHA abrogated genotoxic and oxidative damage in hepatocytes and decreased TNF- α release and 5-lipoxygenase expression in macrophages. In a transactivation assay, 17-HDHA acted in a concentration-dependent manner as a PPAR γ agonist. Taken together, these findings identify a potential role for DHA-derived products, specifically 17S-HDHA and protectin D1, in mediating the protective effects of dietary DHA in necroinflammatory liver injury.—González-Pérez, A., Planagumà, A., Gronert, K., Miquel, R., López-Parra, M., Titos, E., Horrillo, R., Ferré, N., Deulofeu, R., Arroyo, V., Rodés, J., Clària, J. Docosahexaenoic acid (DHA) blunts liver injury by conversion to protective lipid mediators: protectin D1 and 17S-hydroxy-DHA. *FASEB J.* 20, E1844–E1855 (2006)

Key Words: inflammation · liver cells · ω -3 essential fatty acids

VIRTUALLY EVERY TYPE of liver disease has a significant inflammatory component as its underlying cause (1, 2).

Although beneficial as a limited wound-healing process, if the inflammatory response remains uncontrolled or is not properly resolved, it results, in time, in tissue damage, scar accumulation, and fibrosis and eventually in the life-threatening condition of liver cirrhosis (1, 2). Therefore, the development of novel strategies aimed to modulate the factors that govern hepatic inflammation or promote its timely resolution represents a primary focus for disrupting the sequence of events leading to liver injury.

Long chain ω -3 essential fatty acids, found in high proportions primarily in fish oils, display potent anti-inflammatory properties (3). In fact, dietary interventions rich in eicosapentaenoic (EPA, C20:5n-3) and/or docosahexaenoic acid (DHA, C22:6n-3) have been shown to keep inflammation under control without side effects, and therefore are used as preventive measures against a number of illnesses such as rheumatoid arthritis, cystic fibrosis, ulcerative colitis, asthma, atherosclerosis, cancer, and cardiovascular disease (3). However, the molecular mechanisms underlying the beneficial actions of ω -3 essential fatty acids remain to be clearly defined. Recently, a new series of lipid mediators generated from ω -3 essential fatty acids has been identified by lipidomic analyses in exudates that were collected during the resolution phase of acute inflammatory response in mice (4–7). Specifically, during spontaneous resolution, cell-cell interactions and transcellular biosynthesis lead to the production of novel bioactive lipid mediators from DHA and EPA, which have been termed resolvins (resolution phase interaction products) and protectin D1 (10*R*,17*S*-dihydroxy-docosa-4*Z*,7*Z*,11*E*,13*E*,15*Z*,19*Z*-hexaenoic acid or neuroprotectin D1) (4–7). These ω -3-derived lipid mediators display potent anti-inflammatory actions *in vivo* in experimental models of colitis, peritonitis, brain

¹ Correspondence: Department of Biochemistry and Molecular Genetics, Hospital Clínic, Villarroel 170, Barcelona 08036, Spain. E-mail: jclaria@clinic.ub.es
doi: 10.1096/fj.06-6250fe

ischemia-reperfusion, and corneal injury (8–13). In particular, protectin D1 (PD1), a bioactive DHA product generated from the metabolic intermediate 17S-hydro(peroxy)-DHA (17S-H(p)DHA), potently regulates critical events associated with inflammation and its resolution, including inhibition of PMN infiltration and T cell migration and reduction of TNF- α and IFN γ secretion, chemokine formation, and interleukin 1 (IL-1)-induced NF κ B activation (10–13).

Considering the beneficial effects associated with DHA in several clinical disorders, in the current investigation we addressed the question of whether this ω -3 essential fatty acid could protect liver cells from oxidative damage and whether dietary supplements enriched in DHA could exert hepatoprotective actions in mice submitted to an experimental model of liver injury. In this study we also explored potential mechanisms of action by monitoring the generation of bioactive DHA-derived lipid mediators in the liver and testing their biological effects on key events involved in the pathogenesis of necroinflammatory liver injury.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Male 129S2/SvPasCrl mice were purchased from Charles River (Saint Aubin les Elseuf, France). Isoflurane was from Abbott Laboratories (Abbott Park, IL, USA). Carbon tetrachloride (CCl₄), olive oil, choline bitartrate, EDTA, NaCl, Triton-X-100, hydrogen peroxide, propidium iodide, and Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Tris, NaOH, and HEPES were from Merck (Darmstadt, Germany). Murine Raw 264.7 macrophages and CC-1 hepatocytes were purchased from European Collection of Cell Cultures (ECACC, Salisbury, UK). Synthetic DHA, 17-HDHA, 17*R*-HDHA, 14-HDHA, 7-HDHA, 4-HDHA, 15S-hydroxyicosatetraenoic acid (HETE), 12S-hydroxyicosatetraenoic acid, 5S-hydroxyicosatetraenoic acid, and LTB₄ and enzyme immunoassay (EIA) kits for leukotriene (LT) B₄ and prostaglandin (PG) E₂ were purchased from Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA). The TNF- α EIA kit was purchased from Assay Designs (Ann Arbor, MI, USA). Sep-Pak C₁₈ cartridges were from Waters (Milford, MA, USA). Trizol, penicillin-streptomycin, trypsin-EDTA, low melting agarose, and nonessential amino acids were from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Normal melting agarose was from Serva (Heidelberg, Germany). L-Glutamine was from Biological Industries (Kibbutz Beit Haemek, Israel). EMEM, phenol red-free EMEM, and DPBS were purchased from BioWhittaker (Cambrex Co., East Rutherford, NJ, USA). FBS was from Biowest (Nuaille, France). 40% Acrylamide/bis, polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes, and Bio-Safe Coomassie were from Bio-Rad. The enhanced chemiluminescence (ECL) system was from Amersham (Buckinghamshire, UK). The first-strand cDNA synthesis kit was from Promega (Madison, WI, USA). The cyclooxygenase-2 (COX-2) and β -actin assays-on-demand were from Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). Purified ω -3 essential fatty acids were kindly provided by Dr. D. Raederstorff (Roche, Basel, Switzerland) and mouse diets were prepared by U.A.R. (Villemoisson-sur-Orge, France). PPAR γ and luciferase constructs were kindly provided by Dr. Ronald Evans (Salk Institute, La Jolla, CA, USA). Polyclonal rabbit antisera specific for 5-li-

poxygenase (5-LO) (LO-32) was generously provided by Dr. Jilly Evans (Merck Research Laboratories, Rahway, NJ, USA).

Assessment of hepatocyte DNA damage by single-cell gel electrophoresis assay (comet assay)

DNA damage was assessed in murine CC-1 hepatocytes growing in 75 cm² flasks in EMEM with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 20 mM HEPES, 1% nonessential amino acids, 50 U/ml penicillin, and 50 μ g/ml streptomycin following a method adapted from Singh *et al.* (14) and Klaude *et al.* (15). Briefly, CC-1 cells were transferred to 60 mm culture dishes and exposed to hydrogen peroxide (200 μ M) for a total of 1 h in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37°C in the presence of serum-free EMEM medium alone or supplemented with DHA (10 μ M). For experiments examining the biological activity of DHA-derived lipid mediators, CC-1 cells were grown as described above, then treated with 17-HDHA (1 μ M) for 1 h. Subsequently, cells were trypsinized and suspended in DPBS (50 \times 10³ cells/0.2 ml), centrifuged at 800 *g* for 5 min at 4°C, and pellets were resuspended in 200 μ l of 0.5% low melting agarose at 37°C. One hundred microliters of this mixture were spread on an agarose-coated glass slide, covered with a glass coverslip, and left at 4°C for 10 min. Agarose-coated slides were prepared by dipping regular-sized glass slides into 1.5% normal melting agarose, followed by air-drying. Thereafter, coverslips were removed and slides exposed to lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100; pH 10) at 4°C for 1 h. After lysis, slides were exposed to electrophoresis buffer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA; pH 13) for 20 min, then subjected to electrophoresis for 15 min (300 mA, 25 V) at 4°C. Finally slides were neutralized with 400 mM Tris buffer pH 7.5, rinsed with distilled water, stained with propidium iodide (20 μ g/ml), covered with a coverslip, and visualized in a fluorescence microscope (Nikon Eclipse E600, Japan) equipped with a 510–560 nm excitation filter. DNA damage was evaluated following a visual classification of relative intensity of fluorescence in the tail (tail length) and scored into five categories (0–4), with 0 representing undamaged cells and 4 the most severely damaged. Fifty comets per slide were analyzed and DNA damage was expressed as arbitrary units ranging from 0 (all undamaged) to 200 (all maximally damaged).

Measurement of oxidative stress levels

Oxidative stress levels in CC-1 hepatocytes were determined by measuring malondialdehyde (MDA) concentrations in cell lysates by HPLC, as described elsewhere (16). Briefly, CC-1 cells were seeded in 12-well plates at a density of 4 \times 10⁵ cells/ml in complete EMEM medium for 16 h and exposed to hydrogen peroxide (200 μ M) for 1 h in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37°C in the presence of fresh serum-free EMEM medium (without phenol red) alone or supplemented with DHA (1 and 10 μ M). For experiments assessing the biological effects of DHA-derived lipid mediators, cells were grown as described above, then treated with 17-HDHA (1 μ M) for 1 h. At the end of the incubation period, 2 vol of cold methanol were added and cell lysates were collected and evaporated under a stream of nitrogen. Pellets were resuspended in DPBS, homogenized in 0.3% trichloroacetic acid and centrifuged at 8000 *g* for 3 min at 4°C. Supernatants were subsequently exposed to phosphoric and thiobarbituric acids and heated at 80°C for 30 min prior to analysis by HPLC.

Animal studies

Male 129S2/SvPasCrl mice were housed in plastic cages on wood chip bedding and provided free access to water and

standard mouse chow for an acclimation period of 1 wk. Subsequently, mice were assigned to three groups (8 mice each) that were fed a control diet (control group), an experimental diet enriched with DHA (DHA group), or an experimental diet enriched with DHA and EPA (DHA+EPA group). The experimental fatty acids were incorporated into a base fabricated diet composed of starch (522.1 g/kg), sucrose (100 g/kg), cellulose (50 g/kg), casein (190 g/kg), L-cystine (1.8 g/kg), lipids (84.1 g/kg), salt mixture (40 g/kg, ICN 960401), vitamin mixture (10 g/kg, ICN 960402), and choline bitartrate (2 g/kg) (Table 1). The lipid part (84.1 g/kg) was composed of 40 g/kg cocoa butter and either 44.1 g/kg sunflower seed oil (control group) or 30.4 g/kg sunflower seed oil + 13.7 g/kg ω -3 polyunsaturated fatty acids supplied as either purified DHA 70% (DHA group) or a mixture containing 80% DHA and EPA (DHA+EPA group). These diets have been used before as dietary ω -3 essential fatty acid supplements in different animal models of disease (17, 18). The diets were stored at -20°C and provided fresh daily. After 1 wk of feeding the experimental diets, mice received an i.p. injection of CCl_4 (1 ml/kg b.w. in olive oil as a carrier) twice a week for a total of 5 wk. Body weight and food intake were monitored throughout the experiment. After the intervention period, animals were sacrificed under isoflurane anesthesia, and the liver was excised, rinsed in DPBS, and fixed in 10% formol for histological analysis. Portions of liver tissue were also snap-frozen in liquid nitrogen for analysis of gene expression and measurement of eicosanoids and DHA-derived lipid mediators. All animal studies were conducted in accordance with the criteria of the Investigation and Ethics Committee of the Hospital Clinic and the European Community laws governing the use of experimental animals.

Histological analysis

Liver samples fixed in 10% formol were embedded in paraffin, cut at 5 μm sections, and stained with hematoxylin/eosin and Masson's trichrome and analyzed by a registered pathologist (R.M.) unaware of the treatments. The degree of hepatocellular damage was quantified by assessing necroinflammatory injury scored as Grade 0, (absent), Grade 1 (spotty necrosis; one or few necrotic hepatocytes), Grade 2 (confluent necrosis), and Grade 3 (bridging necrosis); and hepatocyte ballooning scored as 1 (low), 2 (mild), and 3 (severe). Liver fibrosis was scored as Stage 0 (absent, normal lobular architecture), Stage 1 (pericentral fibrosis, increased

thickness of the central vein), Stage 2 (central anastomoses, some fibrous septa connecting central veins), Stage 3 (precirrhotic stage, fibrous septa with marked distortion of the liver lobules), and Stage 4 (cirrhosis, nodule regeneration surrounded by broad connective tissue septa). Steatosis was scored by the percentage (%) of liver cells containing fat as 1 (<33%), 2 (<66%), and 3 (>66%).

Analysis of mRNA expression by real-time RT-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA was obtained by the Trizol reagent method. RNA concentration was assessed in a UV spectrophotometer and its integrity was tested on a 6000 LabChip in a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). First-strand cDNA synthesis was performed by incubating 1 μg of total RNA with 4 μl of RT buffer, 2 μl of 10 mM dNTPs, 0.5 μl RNasin, 1 μl of Oligo dT₁₅ (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$), and 1.5 μl of avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (13.5 U) (20 μl final vol) at 42°C for 45 min in a MJ Research PTC-100 thermal cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) was performed with an ABI Prism 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using the fluorescent TaqMan methodology. Ready-to-use primer and probe sets predeveloped by Applied Biosystems (TaqMan Gene Expression Assays) were used to quantify COX-2 (ID: Mm00478374_m1) gene expression using β -actin (ID: Mm00607939_s1) as an endogenous control. Briefly, PCR reactions were performed in duplicate using the Universal TaqMan 2 \times PCR master mix in a volume of 25 μl containing 1 μl cDNA. The thermal profile included 2 min at 50°C and 10 min at 95°C , followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. PCR results were analyzed with the Sequence Detector Software version 2.1 (Applied Biosystems). Relative quantitation of gene expression was performed using the standard curve method. Every set of reactions included four serial 2-fold dilutions of the same liver cDNA sample, which was used to generate standard curves for both the target gene (COX-2) and the endogenous reference (β -actin). The amount of COX-2 was then calculated from the standard curve and divided by the amount of β -actin to obtain a normalized value.

Reverse phase (RP)-HPLC and gas chromatography (GC)/mass spectrometry (MS) analysis

Frozen liver samples were placed in methanol/water (5 ml, 65/35, v/v, 4°C). PGB₂ (100 ng) was added to samples as an internal standard for recovery and livers were gently homogenized at 4°C and extracted by C18-ODS solid phase as previously detailed (11, 19). In brief, homogenized liver suspensions were placed at -20°C for at least 60 min, centrifuged, and supernatants were collected. Supernatants were diluted with 10 volumes of HPLC grade water (4°C) and acidified to pH 4.0 with HCl (1 N). Acidified samples were immediately loaded onto primed C18-ODS cartridges (Accu-Bond II, 500 mg, Agilent Technologies). Cartridges were washed with 10 ml of HPLC grade water followed by hexane and compounds eluted in methyl formate, then by a final elution in methanol. Methyl formate fractions were taken to dryness under a gentle stream of nitrogen, resuspended in methanol (100 μl), and stored at -80°C .

DHA-derived products were analyzed using RP-HPLC and capillary GC/MS analysis as described previously (5, 11). Briefly, analysis was performed with an Agilent 1100 series HPLC system (Agilent Technologies) equipped with a diode array detector (DAD), a binary pump, membrane degasser, heated column compartment, and a microflow cell. Samples

TABLE 1. Composition of the experimental diets^a

Components (g/kg)	Control	DHA	DHA+EPA
Starch	522.1	522.1	522.1
Sucrose	100	100	100
Cellulose	50	50	50
Casein	190	190	190
L-CYSTINE	1.8	1.8	1.8
Salt mixture	40	40	40
Vitamin mixture	10	10	10
Choline bitartrate	2	2	2
Cocoa butter	40	40	40
Sunflower seed oil	44.1	30.4	30.4
DHA	0	13.7	0
DHA+EPA	0	0	13.7

^aAll diets contained the same amount of lipids (84.1 g/kg). DHA: diet enriched in purified docosahexaenoic acid (C22:6n-3); DHA+EPA: diet enriched in a mixture containing docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid (C20:5n-3).

were injected in mobile phase and eluted on a Luna C18–2 minibore column (2×150 mm, 5 μm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) or a Beckman Coulter Ultrasphere column (4.6×250 mm, 5 μm, Phenomenex) using a mobile phase system that consisted of methanol/water/acetate (65/35/0.02, v/v/vol) that was run as a linear gradient to reach 100% methanol/acetate (99.98/0.02, v/v). Collected UV data were recalled at 234 and 270 nm and analyzed by LC 3D ChemStation software (Agilent Technologies). Calibration curves were established for each compound and peak areas were integrated for quantitation.

GC/MS analysis was performed as in ref. 11 with a 6890N GC System with a HP5MS cross-linked ME siloxane column (30 m×0.25 mm×0.25 μm), autosampler, and a 5973N Mass Selective Detector (Agilent Technologies). The helium flow rate was 1.5 ml/min and the initial temperature was 150°C, followed by 230°C (2 min) and 280°C (10 min). For selected samples, HPLC fractions that corresponded to established retention times of authentic standards were collected and derivatized to generate pentafluorobenzyl (PFB) esters and trimethylsilyl (TMS) ether derivatives, and 10–1000 pg was injected into 2 μl iso-octane for GC/MS analysis. Reference material for 10,17S-dihydroxy-DHA (PD1) and 17S-HDHA was prepared as described previously (4, 5, 10, 11). Physical criteria for identification such as HPLC retention times, specific UV chromophores, as well as GC/MS and LC/MS major and signature ions have already been established (4, 5, 10). Endogenous arachidonic acid LO products such as LTB₄, 5,12-diHETE isomers, 12S-HETE, 15S-HETE, 5S-HETE, as well as standards for the docosanoids 7S,17S-dihydroxy-DHA (resolvin D5), 14SHDHA, 7SHDHA, and 4SHDHA, which exhibit similar UV characteristics, had distinct retention times in our HPLC system and did not coelute with 17S-HDHA or PD1.

Analysis of eicosanoids by EIA

Liver tissue samples (0.2 g) were homogenized in cold DPBS²⁺ with an Ultra-Turrax T 25 Basic homogenizer (IKA-Werke, Staufen, Germany). Homogenates were centrifuged at 400 g for 10 min at 4°C. Supernatants were collected and brought to a final volume of 10 ml with distilled water, transferred into syringes, acidified to pH 3.5 and loaded onto C₁₈-silica reverse-phase cartridges. The eluted methyl formate fraction was rapidly evaporated under a stream of nitrogen, resuspended in 1 ml of methanol and kept at –20°C until analysis of PGE₂ by EIA.

Macrophage TNF-α release

The murine macrophage cell line Raw 264.7 was grown in 150 cm² flasks in DMEM supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 50 U/ml penicillin, and 50 μg/ml streptomycin. Cells were transferred to 75 cm² flasks at a density of 6 × 10⁶ cells/flask and grown in serum-free DMEM for 16 h before the addition of vehicle (0.5% ethanol) or 17-HDHA (1 μM) for 2 h in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37°C. At the end of the incubation period, supernatants were collected in tubes containing butylated hydroxytoluene (BHT) (0.01% final concentration) and TNF-α levels determined by a specific EIA kit.

Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ transactivation assay

A transactivation assay based on a fusion protein containing the yeast GAL4 DNA binding domain linked to the ligand binding domain of PPARγ (PPARγ-GAL4 plasmid) and a

luciferase reporter construct containing four copies of a GAL4 upstream activating sequence (UAS_C) and a thymidine kinase (tk) promoter (MH100-tk-luc plasmid) was used to assess the ability of compounds to activate PPARγ independent of endogenous receptors (20). To this end, COS-7 cells (3×10⁴ cells/well) were plated in 12-well plates at 70% confluence and cotransfected with 1 ml of DMEM containing 0.3 μg of the luciferase reporter construct MH100-tk-luc, 0.1 μg of PPARγ-GAL4, and 0.002 μg of β-galactosidase expression vector pCMV (an internal control plasmid containing a cytomegalovirus (CMV) promoter) by using the Effectene transfection reagent at a ratio 1:10 to DNA, according to the manufacturer's instructions. Thirty hours after transfection, the medium was removed and cells were washed twice with DPBS²⁺ before addition of vehicle (0.5% ethanol), 7-HDHA (0.1, 1, 5, and 10 μM), 14-HDHA (0.1, 1, 5, and 10 μM), or 17-HDHA (0.1, 1, 5, and 10 μM) for another 18 h in serum-free DMEM. To determine the stereoselectivity of the alcohol group in position 17, 17R-HDHA (0.1, 1, 5, and 10 μM) was also tested in the PPARγ reporter assay. At the end of the incubation, cells were harvested in luciferase lysis buffer and light units from firefly luciferase and β-galactosidase activities were measured in a Lumat LB 9507 luminometer (Berthold, Bad Wildbad, Germany). Luciferase values were expressed as relative light units and normalized to the level of β-galactosidase activity. Changes in PPARγ activity were expressed as “fold induction” relative to the vehicle control values.

Analysis of 5-LO protein expression by Western blot

Raw 264.7 cells were incubated for 2–24 h with vehicle (0.5% ethanol), DHA (1 and 10 μM), and 17-HDHA (1 μM) in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37°C. At the end of the incubation period, cells were washed in DPBS, scraped from the culture flask, and centrifuged at 1500 g for 5 min. Total protein was extracted in lysis buffer containing 1 M Tris/HCl pH 7.4, 1% triton X-100, 10% glycerol, 137 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, and protease inhibitors. Thereafter, the cell lysate was centrifuged at 1700 g for 5 min at 4°C and 5-LO protein expression in lysate supernatants was analyzed by Western blot as described previously (21). Briefly, aliquots from each sample containing 30 μg of total protein, determined by the Bradford protein assay, were resuspended in SDS-containing Laemmli sample buffer, heated for 5 min at 95°C, and separated through 12.5% SDS-PAGE. Proteins were electroblotted overnight at 4°C onto PVDF membranes and the efficiency of the transfer was visualized by Ponceau staining. Membranes were then soaked for 1 h at room temperature in Tris-buffered saline (20 mM Tris/HCl pH 7.5 and 0.5 M NaCl) containing 0.05% (v/v) Tween 20 (0.05% T-TBS) and 5% (w/v) nonfat dry milk. Blots were washed twice for 5 min each with 0.05% T-TBS and subsequently treated for 2 h at room temperature with an anti-5-LO polyclonal antibody (pAb) (dilution 1:1000) in 0.05% T-TBS containing 1% dry milk. After washing the blots twice for 5 min each with 0.05% T-TBS, the membranes were incubated for 1 h at room temperature with a horseradish peroxidase-linked donkey anti-rabbit antibody (Ab) (dilution 1:2000) in 0.05% T-TBS and subsequently developed using an enhanced chemiluminescence (ECL) detection system.

Statistical analysis of the results was performed using the ANOVA and unpaired Student's *t* test. Results are expressed as mean ± SE and differences were considered significant at a *P* value < 0.05.

RESULTS

To test *in vitro* the potential protective effects of ω -3 essential fatty acids on liver cells, hepatocytes were grown in medium supplemented with DHA; DNA damage, an early event in the initiation and progression of liver injury, was assessed by means of a single-cell gel electrophoresis assay, the so-called comet assay. As shown in Fig. 1A, the length of comet tails, and therefore the extent of DNA strand breaks induced by hydrogen peroxide, was significantly lower in hepatocytes growing in medium supplemented with DHA than that in hepatocytes growing in medium alone. In addition, oxidative stress levels, as determined by measurement of MDA levels by HPLC in cell lysates, was

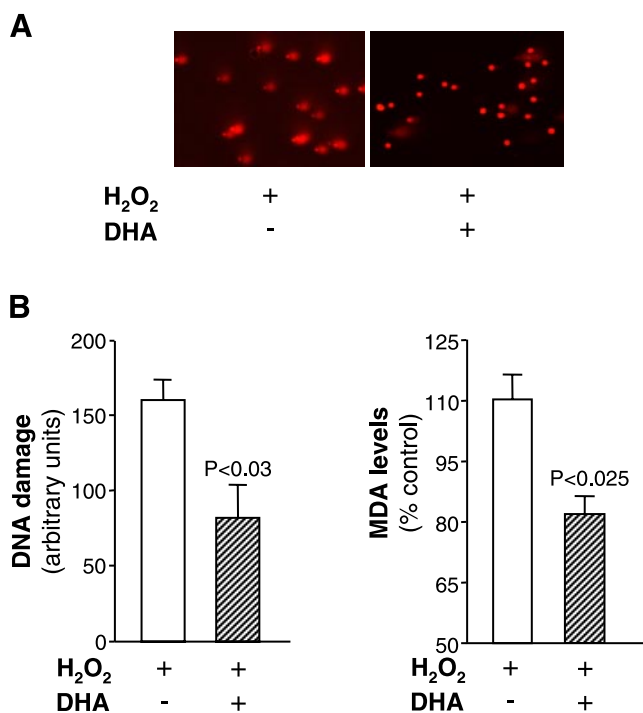


Figure 1. Effects of DHA supplementation on liver cells in culture. *A*) Effect on DNA damage. Murine CC-1 hepatocytes were exposed to hydrogen peroxide (200 μ M) for a total of 1 h in a humidified 5% CO_2 atmosphere at 37°C in the presence of serum-free EMEM medium alone or supplemented with DHA (10 μ M). DNA damage was assessed by the single-cell gel electrophoresis assay (comet assay). Comet images (original magnification $\times 200$) are representative of 3 different experiments. The relative intensity of fluorescence in the tail (tail length) was visually scored in 50 comets per slide and assigned as arbitrary units ranging from 0 (all undamaged) to 200 (all maximally damaged) (see Material and Methods for more details). Data are expressed as mean \pm SE and *P* value is referred with respect to vehicle. *B*) Effect on oxidative stress. CC-1 cells were exposed to hydrogen peroxide (200 μ M) for 1 h in a humidified 5% CO_2 atmosphere at 37°C in the presence of fresh serum-free EMEM medium (without phenol red) alone or supplemented with DHA (10 μ M). Oxidative stress levels were determined by measuring MDA concentrations in cell lysates as described in Material and Methods. Results are the mean \pm SE of 4 different experiments and *P* values are given with respect to untreated cells.

also significantly decreased in hepatocytes growing in a medium rich in DHA (Fig. 1B).

To extend these protective actions of DHA observed in hepatocytes at the *in vivo* level, we administered diets supplemented with DHA to mice submitted to the experimental model of CCl_4 -induced liver injury and compared the hepatic necroinflammatory damage with that of mice receiving a control diet. As expected, histological examination of livers from mice treated with CCl_4 for 5 wk revealed massive and severe hepatocyte necrosis, inflammation, and ballooning at the centrilobular zone with bridging of necrosis that severely disrupted the sinusoidal and lobular architecture of the liver (Fig. 2A, upper panels). A significant improvement in hepatic pathology occurred in mice fed the experimental diets enriched with either DHA (Fig. 2A, middle panels) or DHA+EPA (Fig. 2A, lower panels). In fact, the scores for necroinflammatory liver injury were significantly lower in mice fed with ω -3-enriched experimental diets than in those receiving a control diet (Fig. 2B). In addition, the diet enriched with DHA+EPA reduced ballooning degeneration in hepatocytes (Fig. 2B). Mice consumed between 2.11 and 2.36 g of food per day, and there were no significant differences in food intake, body weight gain, and relative liver weight among the animals receiving DHA-enriched diets and controls (data not shown). Feeding ω -3-enriched diets did not affect the degree of hepatic steatosis (score from 1 to 3: control: 1.0 ± 0.0 ; DHA: 1.1 ± 0.1 ; DHA+EPA: 1.0 ± 0.0). Fibrosis was not observed in any group of the study (data not shown).

We next assessed the profile of bioactive lipid mediators generated in livers from mice fed DHA-enriched diets. We first monitored changes in the proinflammatory COX-2 pathway by quantitative real-time RT-PCR analysis and the formation of the ω -6-derived eicosanoid, PGE_2 , by EIA. As shown in Fig. 3A, administration of diets enriched with ω -3 essential fatty acids led to significant decreases in COX-2 mRNA expression in the liver. Accordingly, the hepatic levels of PGE_2 were significantly reduced in both DHA and DHA+EPA groups (Fig. 3B). We also assessed by RP-HPLC and GC/MS analysis the formation of potent anti-inflammatory and proresolution DHA-derived lipid mediators in livers from mice fed a DHA-enriched diet. Specifically, PD1 as well as 17S-HDHA, a marker of activation of the PD1 pathway and potential metabolic precursor for the trihydroxy 17S-resolvins (RevD1-D4), were identified as unique products in liver samples obtained from the DHA group and were not detected in liver samples from the control diet group (Fig. 4A, C). PD1 was identified by coelution with the biosynthetic standard and by its characteristic UV spectrum, which is consistent with the presence of a conjugated triene double bond structure (Fig. 4A, inset). 17S-HDHA was identified as a peak that matched the retention time (Fig. 4C) and the characteristic conjugated diene chromophore of the synthetic 17S-HDHA standard. 14S-Hydroxy-DHA (14S-HDHA) was also detected in livers obtained from animals receiving the DHA diet and, like 17S-

HDHA, was not detected in mice from the control diet group (Fig. 4C). To further confirm the identity of the DHA-derived products in liver samples, materials beneath the PD1 and 17S-HDHA peaks were individually collected and their methyl ester trimethylsilyl derivatives were prepared and taken for GC/MS analysis. As shown in Fig. 4B, PD1 was identified by its MS spectrum, which displayed ions at m/z 503, 413, and 323, which are diagnostic for a dihydroxy DHA structure, whereas material eluting beneath 17S-HDHA (Fig. 4D)

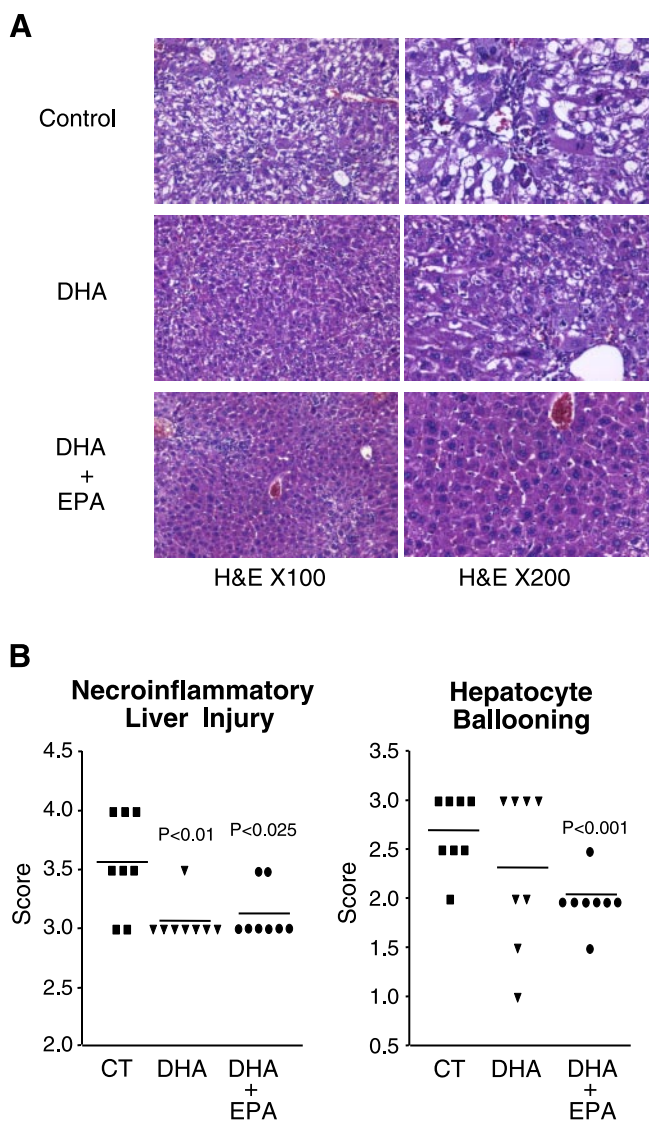


Figure 2. DHA-enriched diets prevent CCl_4 -induced hepatocellular necrosis. *A*) Representative photomicrographs of liver sections stained with hematoxylin/eosin from 5 wk CCl_4 -treated mice receiving a control diet (upper panels), a diet supplemented with DHA (middle panels), and a diet supplemented with a mixture of DHA and EPA (lower panels). These data are representative of 24 mice. *B*) The hepatocellular damage observed in hematoxylin/eosin-stained liver sections was analyzed by a registered pathologist unaware of the treatments and scored as described in Material and Methods. Results are expressed as mean \pm SE and P values are calculated with respect to the control (CT) group.

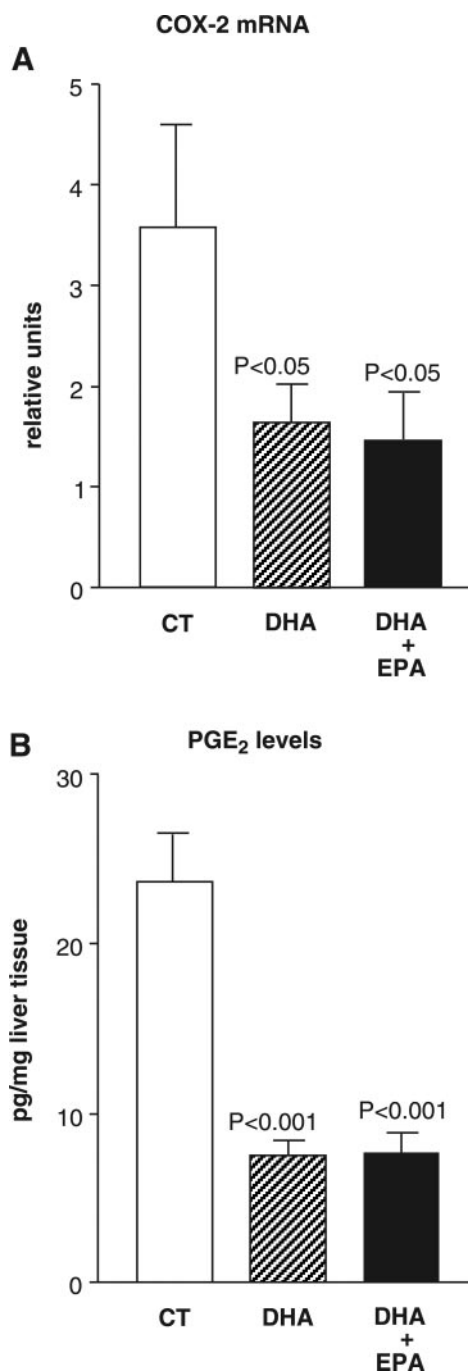
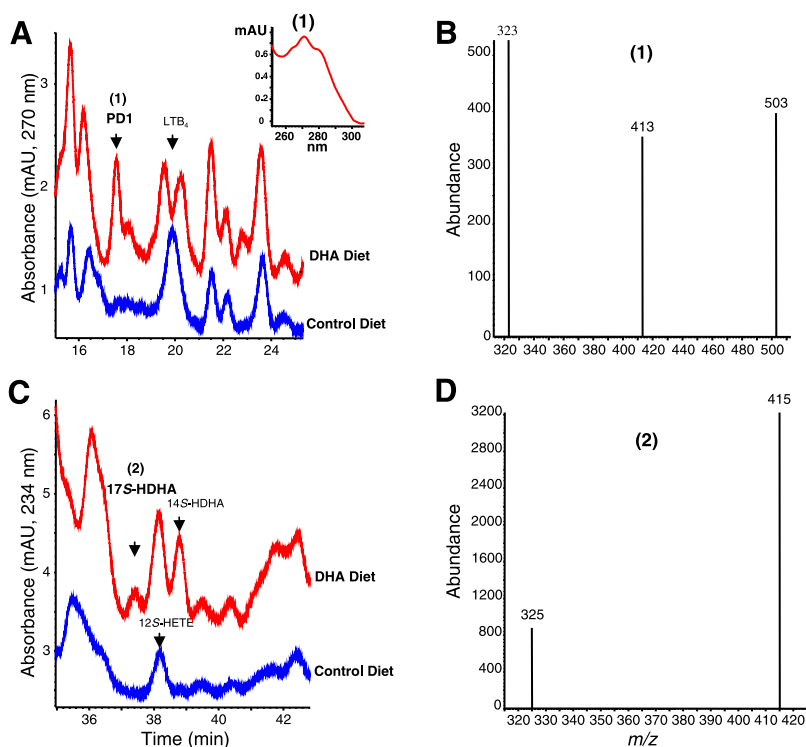


Figure 3. Effects of DHA-enriched diets on COX-2 mRNA expression and PGE_2 levels in livers from CCl_4 -treated mice. *A*) Liver tissue was obtained after 5 wk of CCl_4 treatment from mice receiving either a control diet (CT) ($n=8$), a diet enriched with DHA (DHA) ($n=8$), or a diet enriched with a mixture of DHA and EPA (DHA+EPA) ($n=8$). After RNA extraction, COX-2 mRNA expression was determined by real-time RT-PCR. Results are expressed as the mean \pm SE and P values are given *vs.* the CT group. *B*) Liver tissue was obtained after 5 wk of CCl_4 treatment from the three groups of mice (CT, DHA, and DHA+EPA) and samples were homogenized, extracted in C_{18} -silica reverse-phase cartridges, and PGE_2 levels were determined by a highly specific EIA. Results are expressed as the mean \pm SE and P values are given *vs.* the CT group.

Figure 4. Endogenous formation of PD1 and 17S-HDHA in the liver of mice receiving a DHA-enriched diet. Liver tissue was obtained after 5 wk of CCl₄ treatment from mice receiving either a control diet or a diet enriched with DHA. Samples were extracted and analyzed by DAD/RP-HPLC analysis at 270 nm (A) and 234 nm (C) for diene-carrying and triene-carrying compounds, respectively. Retention times of authentic standards are indicated by arrows. The UV chromophore of the peak (1) coeluting with 10,17S-dihydroxy-docosatriene (PD1) is shown in inset (A). GC/MS chromatograms for peaks coeluting with PD1 (1) and 17S-HDHA (2) are shown in panels B, D, respectively. Results are representative of *n* = 4.



displayed ions at *m/z* 415 and 325, which are diagnostic for a monohydroxy DHA structure.

To explore whether DHA-derived lipid signals could mediate the hepatoprotective effects associated with DHA-enriched diets, we set out a series of experiments in hepatocytes as well as in macrophages, the cell type that plays a major role in initiating the cascade of events leading to liver inflammation and injury (22). As shown in **Fig. 5**, 17-HDHA, a lipid signal identified in the liver of mice fed with a DHA-enriched diet and a marker of activation of the PD1 pathway, displayed potent biological activity in these cells. This lipid mediator, in addition to reducing the genotoxic damage (**Fig. 5A**) and improving the oxidative stress status (**Fig. 5B**) in hepatocytes, significantly inhibited TNF- α release by murine macrophages (**Fig. 5C**).

Given that PPAR γ is a central inhibitor of the inflammatory and fibrogenic responses in the liver (23), we next assessed whether 17-HDHA and other DHA-derived monohydroxy acids were able to bind and activate this nuclear receptor. To avoid any interference from the endogenous receptor, we tested the compounds in a cell-based PPAR γ reporter assay. In this assay, 17-HDHA acted in a concentration-dependent manner as an agonist of PPAR γ (**Fig. 6A**). This effect was stereoselective since 17*R*-HDHA did not activate this nuclear receptor (**Fig. 6A**, inset). Whereas 14-HDHA appeared not to be active in this reporter assay (**Fig. 6B**), 7-HDHA was a potent agonist and activated PPAR γ to a similar extent that 17-HDHA (**Fig. 6C**).

To further characterize the mechanisms underlying the hepatoprotective effects of ω -3 essential fatty acids, we assessed the effects of these compounds in the formation of leukotrienes (LTs), which are key effectors of hepatocellular injury (21, 24, 25). As shown in

Fig. 7A, hepatic levels of LTB₄ were lower in mice fed a diet rich in DHA than in those receiving a control diet. This finding was consistent with a reduction in 5-LO protein expression in murine macrophages growing for > 2 h in a medium supplemented with DHA as well as in macrophages exposed to 17-HDHA (**Fig. 7B**). On the other hand, no changes in COX-2 mRNA expression were observed in murine macrophages incubated with either DHA or 17-HDHA (relative expression to vehicle; DHA 10 μ M: 1.2 \pm 0.3 and 17-HDHA 1 μ M: 1.3 \pm 0.3).

DISCUSSION

The major findings of our study were that the ω -3 essential fatty acid, DHA, prevented DNA damage and oxidative stress in liver cells, and significantly reduced necroinflammatory liver injury in mice submitted to an experimental model of liver injury. These hepatoprotective effects were associated with a decrease in the hepatic formation of ω -6-derived eicosanoids (*i.e.*, PGE₂) and a concomitant increase in the generation of protective DHA-derived lipid mediators (*i.e.*, PD1 and 17S-HDHA). The beneficial role of these recently discovered DHA-derived lipid signals was further supported by experiments *in vitro* demonstrating that synthetic 17-HDHA exerts potent protective actions in hepatocytes and reduces TNF- α release and 5-LO activity in macrophages.

Our findings provide a molecular mechanism for the protective effects of dietary ω -3 fatty acid supplementation, namely via the formation of anti-inflammatory DHA-derived lipid mediators. Our results, which demonstrate abrogation of necroinflammatory liver injury

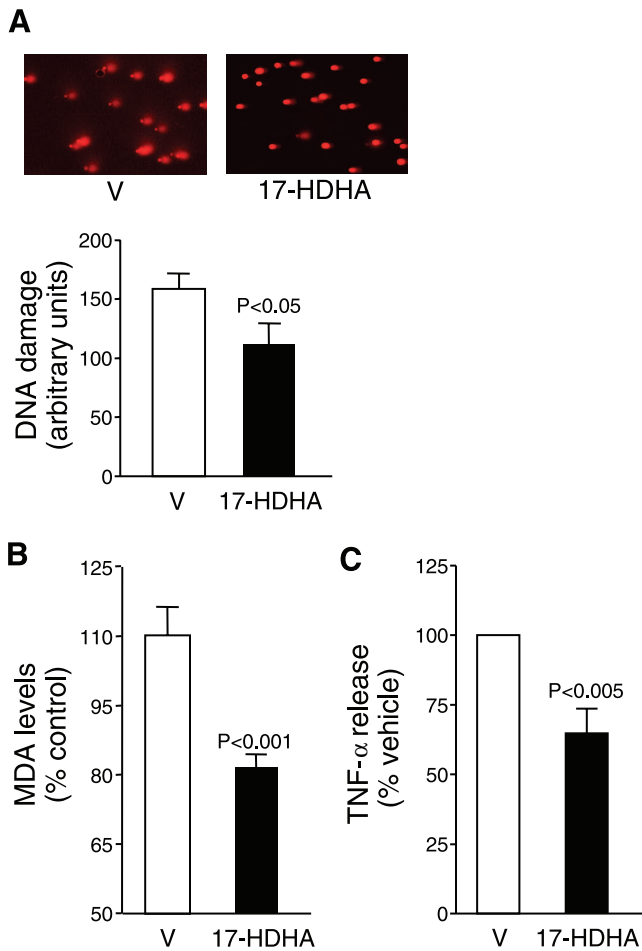


Figure 5. Biological effects of 17-HDHA in hepatocytes and macrophages. Murine CC-1 hepatocytes were incubated with vehicle (0.5% ethanol) or 17-HDHA (1 μ M) in the presence of hydrogen peroxide for 1 h at 37°C, and genotoxic damage (A) and oxidative stress (B) were determined by the comet assay and by measuring MDA concentrations in cell lysates, respectively. Comet images (original magnification \times 200) are representative of 4 different experiments, and comet tail length was scored as described in Fig. 1 legend and Material and Methods section. Results are the mean \pm SE and *P* values are given with respect to untreated cells. C) Murine raw 264.7 macrophages were incubated with vehicle or 17-HDHA (1 μ M) for 2 h at 37°C and TNF- α levels in cell supernatants determined by EIA. Results are the mean \pm SE of 4 different experiments. *P* values are given with respect to untreated cells.

with ω -3 dietary supplementation, are consistent with earlier observations suggesting that the amount and type of dietary essential fatty acids may modulate the progression of liver disease. Along these lines, previous studies in Rhesus monkeys provided evidence that feeding with an experimental diet low in ω -3 fatty acids predisposes these animals to develop alcoholic fatty liver and fibrosis (26). Moreover, in Long-Evans Cinnamon rats, an experimental model of Wilson disease in which copper accumulates in the liver because of a mutation in the copper-transporting ATPase gene, ω -3 fatty acids were previously shown to suppress the development of acute hepatitis and to prolong survival (27).

However, our findings differ from those reported by Nanji *et al.* in rats submitted to alcohol-induced liver injury, in which a diet composed entirely of fish oil containing both DHA and EPA combined with ethanol was shown to exacerbate fatty liver, inflammation, and fibrosis (28, 29). Whether differences in the species or the experimental model of liver injury account for this discrepancy is a subject that deserves further investigation. On the other hand, we did not find changes in the extent of hepatic steatosis between mice receiving the ω -3-enriched diets and those fed a control diet. This subject also deserves further investigation using a proper animal model of steatohepatitis, since ω -3 fatty acids are negative regulators of hepatic lipogenesis and their supplementation has been shown to protect the liver against hepatic lipid deposition in obese mice (30, 31).

The mechanisms underlying the hepatoprotective effects of long chain ω -3 essential fatty acids are not completely understood. A rather widely accepted mechanism of action for these compounds is that they

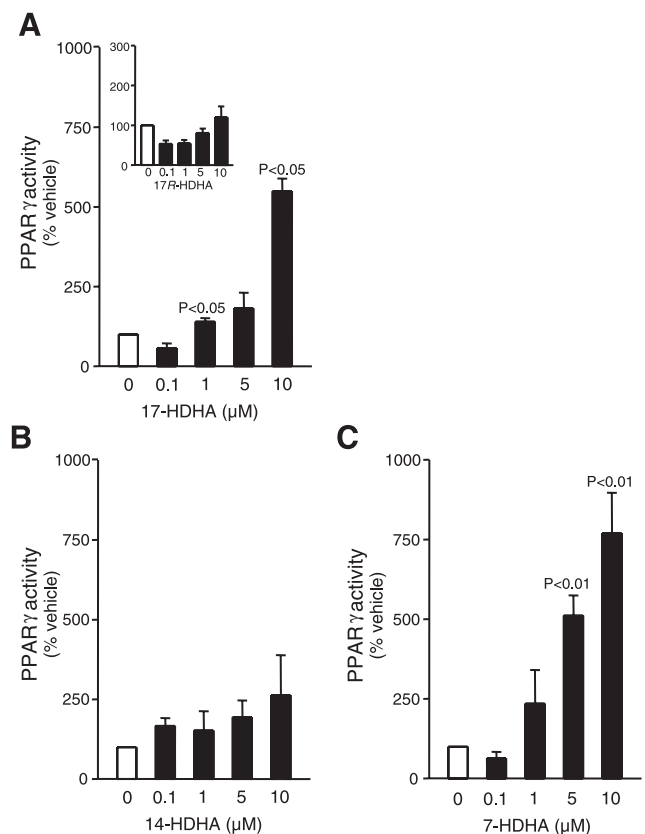


Figure 6. Effects of DHA-derived products on PPAR γ activity. The activation of PPAR γ by selected DHA-derived products was assessed in a cell-based luciferase reporter transactivation assay after incubation with increasing concentrations (0.1, 1, 5, and 10 μ M) of 17-HDHA (A), 14-HDHA (B), and 7-HDHA (C) for 18 h. Luciferase activity was normalized to the level of β -gal activity and results expressed as fold induction relative to untreated cells. The stereoselective effects of the alcohol group in the position 17 (17*R*-HDHA, μ M) are shown in the inset. Results are the mean \pm SE of 3 different experiments with duplicate determinations. *P* values are given *vs.* untreated cells.

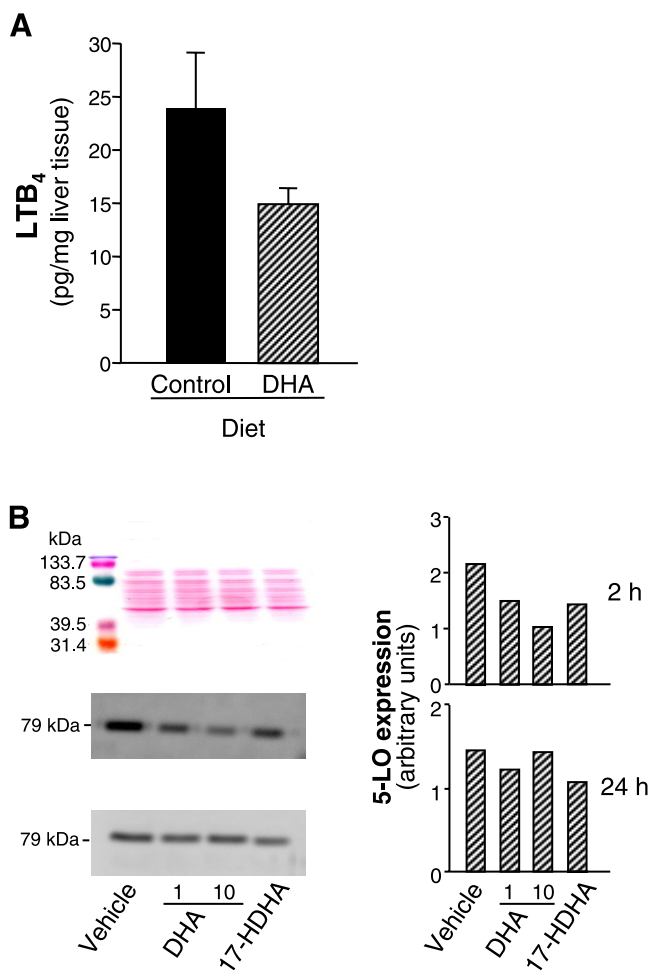


Figure 7. Dietary modulation of the 5-LO pathway and inhibition of macrophage 5-LO protein expression by 17-HDHA. *A*) Liver tissue was obtained after 5 wk of CCl₄ treatment from mice receiving either a control diet or a diet enriched with DHA. Samples were extracted and LTB₄ levels determined by RP-HPLC. *B*) Murine macrophages were incubated in the presence or absence of medium supplemented with two concentrations of DHA (1 and 10 μM) or treated with synthetic 17-HDHA (1 μM). Equal quantities of total protein (30 μg) were separated on a 12.5% SDS-PAGE gel, electrotransferred onto PVDF membranes, and analyzed by Western blot. Upper blot is representative of a Ponceau-stained membrane used as a loading control protein. Middle and lower blots are representative of protein bands detected by a specific anti-5-LO Ab after exposing cells to the compounds for 2 and 24 h, respectively. The densitometric analysis of 5-LO positive bands from these blots is shown on the right.

prevent the conversion of arachidonic acid into proinflammatory eicosanoids through the COX and 5-LO pathways either by competing with the substrate or by inhibiting the activity of eicosanoid-generating enzymes (32, 33). In fact, in our study a significant reduction in COX-2 mRNA expression associated with decreased hepatic levels of PGE₂ was observed in mice fed the experimental diets enriched with ω-3 fatty acids. A similar inhibitory effect on the expression of this key inflammatory gene was previously reported in men with prostate cancer fed a fish oil-supplemented diet, in

bovine chondrocytes and rat hepatoma cells exposed to α-linolenic acid, and in human colon cancer cells incubated with either DHA or fish oil (33–37). Given that COX-2 is markedly increased in rats with CCl₄-induced liver injury and selective COX-2 inhibition prevents liver fibrosis in these animals (23), we speculate that down-regulation of hepatic COX-2 levels contributes to the protective actions of ω-3 fatty acids in this organ. Note that by real-time PCR we did not observe a decrease in COX-2 mRNA expression in murine macrophages incubated with DHA and DHA-derived products, suggesting that the reduction of COX-2 expression in livers from mice receiving DHA is likely to reflect a decrease in the number of COX-2-expressing inflammatory cells rather than a decrease in COX-2 expression in liver cells.

The most important observation of our study was that the decrease in COX-2 expression and PGE₂ levels in livers from animals receiving a DHA-enriched diet was associated with an increase in the formation of DHA-derived anti-inflammatory mediators, namely PD1 and 17S-HDHA. PD1, 10*R*,17*S*-dihydroxy-docosatriene, is of particular interest as this DHA-derived mediator was originally identified in neural tissues and termed neuroprotectin (reviewed in ref. 7). However, the protective actions of neuroprotectin D1 as well as its endogenous formation are not restricted to the nervous system. Hence, it was recently renamed protectin D1 (PD1) and the complete stereochemistry has been assigned (12, 13). PD1 is a potent regulator of inflammation, and its formation may play a role in the anti-inflammatory and protective properties attributed to DHA. In fact, PD1 has been shown to decrease COX-2 mRNA expression, block NFκB activation in the mouse hippocampus as well as in neural cells in culture (10), and inhibit IL-1β-induced COX-2 expression in human retinal pigment epithelial cells (38). In addition, both PD1 and 17S-HDHA potently inhibit TNF-α-induced IL-1β gene expression in human microglial cells (4).

Macrophages, which in response to a noxious agent release an array of soluble factors such as cytokines, reactive oxygen species (ROS), and eicosanoids, are recognized as the predominant effector cells involved in the inflammatory cascade leading to liver damage (22). 17-HDHA, a DHA-derived lipid mediator that is a marker of activation of the PD1 pathway, is also a potential metabolic precursor to the trihydroxy 17*S*-resolvins (RevD1-D4) by a mechanism analogous to the metabolism of 15-HETE by 5-LO, which generates lipoxin A₄. In our study, 17-HDHA consistently inhibited TNF-α release in murine macrophages. A similar effect was recently reported by Ariel *et al.* in lymphocytes exposed to increasing concentrations of PD1 (12). Similar inhibitory effects on TNF-α release have also been demonstrated in human monocytes exposed to DHA and EPA and in rodent macrophages growing in the presence of fish oil (39, 40). *In vivo*, supplementation of the diet of human volunteers with fish oil containing both DHA and EPA or feeding fish oil to

rodents is also associated with a decrease in the production of TNF- α (41, 42). Since an increased production of TNF- α by liver macrophages is clearly implicated in the pathogenesis of alcoholic liver disease and liver fibrosis (43), down-regulation of this key proinflammatory cytokine in macrophages treated with 17-HDHA may in part account for the protective effects of dietary DHA in necroinflammatory liver injury. We also noted a decrease in 5-LO protein expression in macrophages treated with 17-HDHA, a finding consistent with the reduction of LTB₄ formation seen in livers from mice supplemented with a DHA-enriched diet. Given that the presence of an active 5-LO pathway in the liver is restricted to Kupffer cells and inhibition of the 5-LO pathway in these resident macrophages has been shown to attenuate necroinflammatory liver injury and fibrosis (21, 24, 25), these data provide an additional beneficial action of DHA and DHA-derived lipid mediators in the liver.

Another interesting finding of the current study was that 17-HDHA acted in a concentration-dependent manner as a PPAR γ ligand. This effect appears to show positional selectivity of the alcohol group in the DHA monohydroxy acid since 7-HDHA, but not 14-HDHA or 17*R*-HDHA, also exerted a potent activation of PPAR γ . Nevertheless, the biological significance of this 7-HDHA-induced PPAR γ activation is uncertain in the context of the liver because contrary to 17*S*-HDHA and 14*S*-HDHA, 7*S*-HDHA was not detected in the liver of mice fed a DHA-enriched diet. In any event, since PPAR γ is widely recognized as an anti-inflammatory and antifibrogenic system in the liver (23), its activation by DHA-derived products is likely to contribute to the protective actions exerted by DHA-enriched diets in this organ.

The results of the current study strongly support the concept that patients with liver disease might benefit from a dietary supplementation with ω -3 essential fatty acids. A status characterized by essential fatty acid deficiency is a common finding in alcoholic and non-alcoholic patients either with compensated or decompensated cirrhosis as well as in other liver disorders such as acute hepatitis and cholestasis (44). This deficiency appears to be generalized since levels of fatty acids are not only decreased in plasma and blood cells (erythrocytes and platelets), but also in adipocytes and gastric mucosa (45–48). Moreover, in cirrhotic patients, an inverse relationship between plasma levels of DHA and the severity of liver disease has been established (49). The high prevalence of essential fatty acid deficiency in liver diseases is not surprising considering that the enzymatic machinery involved in long chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis largely predominates in the liver (50).

In conclusion, using a well-established animal model of liver injury, we demonstrate that dietary ω -3 fatty acids are protective by reducing the incidence and severity of liver damage. More important, we demonstrate for the first time that dietary supplementation amplifies formation of DHA-derived anti-inflammatory

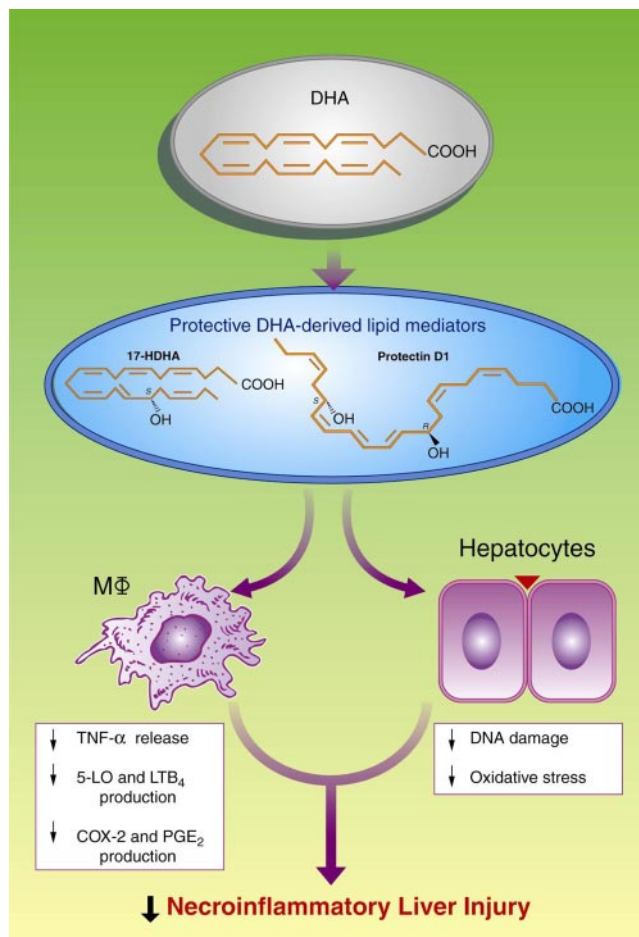


Figure 8. Schematic diagram illustrating the formation and protective actions of DHA-derived lipid mediators in the liver. Protectin D1 and 17*S*-HDHA are novel bioactive lipid mediators derived from DHA with potent protective actions. These lipid signals may ameliorate necroinflammatory liver injury by reducing DNA damage and oxidative stress in hepatocytes and by down-regulating TNF- α release and 5-LO and COX-2 activities in macrophages (M Φ).

lipid signals, namely PD1 and 17*S*-HDHA, in the liver. These novel lipid signals attenuated DNA damage and oxidative stress in hepatocytes as well as key markers of inflammation in macrophages, and thus provide a mechanism of action for the protection afforded by DHA dietary supplementation against necroinflammatory liver injury (Fig. 8). Hence, these findings may provide the rational basis for dietary supplementation with ω -3 fatty acids in patients with liver disease. [FJ]

These studies were supported in part by grants from Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF 03/0586 and SAF 06/00586) and Instituto de Salud Carlos III (C03/02) (to J.C.) and National Institutes of Health (EY016136) (to K.G.). A. González-Pérez was supported by Ministerio de Ciencia y Tecnología (contract number BES-2004–5054). R.H. was supported by Generalitat de Catalunya and A.P. and E.T. were supported by IDIBAPS. We thank Dr. R. Evans (Salk Institute, La Jolla, CA, USA) for the kind gift of the constructs needed for PPAR γ transactivation studies and Dr. J. Evans (Merck Research Laboratories, Rahway, NJ, USA) for providing the 5-LO Ab. We are also indebted to Dr. E. Cespedes for her

assistance in the comet assay, to R. Kemp for expert assistance in the GC/MS analyses, and to C. Bauchet for assistance with HPLC.

REFERENCES

1. Friedman, S. L. (1993) Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. *N. Engl. J. Med.* **328**, 1828–1835
2. Lotersztajn, S., Julien, B., Teixeira-Clerc, F., Grenard, P., and Mallat, A. (2005) Hepatic fibrosis: molecular mechanisms and drug targets. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **45**, 605–628
3. Calder, P. C. (2002) Dietary modification of inflammation with lipids. *Proc. Nutr. Soc.* **61**, 345–358
4. Hong, S., Gronert, K., Devchand, P. R., Moussignac, R.-L., and Serhan, C. N. (2003) Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells. Autacoids in anti-inflammation. *J. Biol. Chem.* **278**, 14677–14687
5. Serhan, C. N., Hong, S., Gronert, K., Colgan, S. P., Devchand, P. R., Mirick, G., and Moussignac, R. L. (2002) Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. *J. Exp. Med.* **196**, 1025–1037
6. Serhan, C. N., Clish, C. B., Brannon, J., Colgan, S. P., Chiang, N., and Gronert, K. (2000) Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. *J. Exp. Med.* **192**, 1197–1204
7. Serhan, C. N., Gotlinger, K., Hong, S., and Arita, M. (2004) Resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins, novel omega-3-derived mediators, and their aspirin-triggered endogenous epimers: an overview of their protective roles in catabasis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **73**, 155–172
8. Arita, M., Yoshida, M., Hong, S., Tjonahen, E., Glickman, J., Petasis, N. A., Blumberg, R. S., and Serhan, C. N. (2005) Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from omega-3 eicosapentaenoic acid, protects against 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 7671–7676
9. Arita, M., Bianchini, F., Aliberti, J., Sher, A., Chiang, N., Hong, S., Yang, R., Petasis, N. A., and Serhan, C. N. (2005) Stereochemical assignment, antiinflammatory properties, and receptor for the omega-3 lipid mediator resolvin E1. *J. Exp. Med.* **201**, 713–722
10. Marcheselli, V. L., Hong, S., Lukiw, W. J., Tian, X. H., Gronert, K., Musto, A., Hardy, M., Gimenez, J. M., Chiang, N., Serhan, C. N., and Bazan, N. G. (2003) Novel docosanoids inhibit brain ischemia-reperfusion-mediated leukocyte infiltration and proinflammatory gene expression. *J. Biol. Chem.* **278**, 43807–43817
11. Gronert, K., Maheshwari, N., Khan, N., Hassan, I. R., Dunn, M., and Laniado Schwartzman, M. (2005) A role for the mouse 12/15-lipoxygenase pathway in promoting epithelial wound healing and host defense. *J. Biol. Chem.* **280**, 15267–15278
12. Ariel, A., Li, P.-L., Wang, W., Tang, W.-X., Fredman, G., Hong, S., Gotlinger, K. H., and Serhan, C. N. (2005) The docosatriene protectin D1 is produced by TH2 skewing and promotes human T cell apoptosis via lipid raft clustering. *J. Biol. Chem.* **280**, 43079–43086
13. Serhan, C. N., Gotlinger, K., Hong, S., Lu, Y., Siegelman, J., Baer, T., Yang, R., Colgan, S. P., and Petasis, N. A. (2006) Anti-inflammatory actions of neuroprotectin D1/protectin D1 and its natural stereoisomers: assignments of dihydroxy-containing docosatrienes. *J. Immunol.* **176**, 1848–1859
14. Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R., and Schneider, E. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* **175**, 184–191
15. Klaude, M., Eriksson, S., Nygren, J., and Ahnström, G. (1996) The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat. Res.* **363**, 89–96
16. Halliwell, B., and Chirico, S. (1993) Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* **57**, 715S–724S
17. Rousseau, D., Hélices-Toussaint, C., Raederstorff, D., Moreau, D., and Grynberg, A. (2001) Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids affect the development of renovascular hypertension in rats. *Mol. Cell. Biochem.* **225**, 109–119
18. Rousseau, D., Hélices-Toussaint, C., Moreau, D., Raederstorff, D., and Grynberg, A. (2003) Dietary n-3 PUFAs affect the blood pressure rise and cardiac impairments in a hyperinsulinemic rat model in vivo. *Am. J. Physiol.* **285**, H1294–H1302
19. Gronert, K., Clish, C. B., Romano, M., and Serhan, C. N. (1999) Transcellular regulation of eicosanoid biosynthesis. *Methods Mol. Biol.* **120**, 119–144
20. Forman, B. M., Tontonoz, P., Chen, J., Brun, R. P., Spiegelman, B. M., and Evans, R. M. (1995) 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell.* **83**, 803–812
21. Titos, E., Clària, J., Planagumà, A., López-Parra, M., González-Pérez, A., Gaya, J., Miquel, R., Arroyo, V., and Rodés, J. (2005) Inhibition of 5-lipoxygenase-activating protein abrogates experimental liver injury: role of Kupffer cells. *J. Leukoc. Biol.* **78**, 871–878
22. Decker, K. (1990) Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur. J. Biochem.* **192**, 245–261
23. Planagumà, A., Clària, J., Miquel, R., López-Parra, M., Titos, E., Masferrer, J. L., Arroyo, V., and Rodés, J. (2005) The selective cyclooxygenase-2 inhibitor SC-236 reduces liver fibrosis by mechanisms involving non-parenchymal cell apoptosis and PPARgamma activation. *FASEB J.* **19**, 1120–1122
24. Titos, E., Clària, J., Bataller, R., Bosch-Marcé, M., Ginès, P., Jiménez, W., Arroyo, V., Rivera, F., and Rodés, J. (2000) Hepatocyte-derived cysteinyl leukotrienes modulate vascular tone in experimental cirrhosis. *Gastroenterology* **119**, 794–805
25. Titos, E., Clària, J., Planagumà, A., López-Parra, M., Villamor, N., Párrizas, M., Carrió, A., Miquel, R., Jiménez, W., Arroyo, V., et al. (2003) Inhibition of 5-lipoxygenase induces cell growth arrest and apoptosis in rat Kupffer cells: implications for liver fibrosis. *FASEB J.* **17**, 1745–1747
26. Pawlosky, R. J., and Salem, N. (2004) Development of alcoholic liver and fibrosis in rhesus monkeys fed a low n-3 fatty acid diet. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **28**, 1569–1576
27. Du, C., Fujii, Y., Ito, M., Harada, M., Moriyama, E., Shimada, R., Ikemoto, A., and Okuyama, H. (2004) Dietary polyunsaturated fatty acids suppress acute hepatitis, alter gene expression and prolong survival of female Long-Evans Cinnamon rats, a model of Wilson disease. *J. Nutr. Biochem.* **15**, 273–280
28. Nanji, A. A., Zhao, S., Sadrzadeh, S. M., Dannenberg, A. J., Tahan, S. R., and Waxman, D. J. (1994) Markedly enhanced cytochrome P450 2E1 induction and lipid peroxidation is associated with severe liver injury in fish oil-ethanol-fed rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **18**, 1280–1285
29. Nanji, A. A., Jokelainen, K., Tipoe, G. L., Rahemtulla, A., and Dannenberg, A. J. (2001) Arginine reverses ethanol-induced inflammatory and fibrotic changes in liver despite continued ethanol administration. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **299**, 638–644
30. Sekiya, M., Yahagi, N., Matsuzaka, T., Najima, Y., Nakakuki, M., Nagai, R., Ishibashi, S., Osuga, J., Yamada, N., and Shimano, H. (2003) Polyunsaturated fatty acids ameliorate hepatic steatosis in obese mice by SREBP-1 suppression. *Hepatology* **38**, 1529–1539
31. Alwayn, I., Andersson, C., Zauscher, B., Gura, K., Nosé, V., and Puder, M. (2005) Omega-3 fatty acids improve hepatic steatosis in a murine model: potential implications for the marginal steatotic liver donor. *Transplantation* **79**, 606–608
32. Bagga, D., Wang, L., Farias-Eisner, R., Glaspy, J. A., and Reddy, S. T. (2003) Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 1751–1756
33. Vecchini, A., Ceccarelli, V., Susta, F., Caligiana, P., Orvietani, P., Binaglia, L., Nocentini, G., Riccardi, C., Calviello, G., Palozza, P., et al. (2004) Dietary alpha-linolenic acid reduces COX-2 expression and induces apoptosis of hepatoma cells. *J. Lipid Res.* **45**, 308–316
34. Aronson, W. J., Glaspy, A., Reddy, S. T., Reese, D., Herber, D., and Bagga, D. (2001) Modulation of omega-3/omega-6 polyunsaturated ratios with dietary fish oils in men with prostate cancer. *Urology* **58**, 283–288

35. Curtis, C. L., Hughes, C. E., Flannery, C. R., Little, C. B., Harwood, J. L., and Caterson, B. (2000) n-3 fatty acids specifically modulate catabolic factors involved in articular cartilage degradation. *J. Biol. Chem.* **275**, 721–724
36. Narayanan, B. A., Narayanan, N. K., Simi, B., and Reddy, B. S. (2003) Modulation of inducible nitric oxide synthase and related proinflammatory genes by the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid in human colon cancer cells. *Cancer Res.* **63**, 972–979
37. Llor, X., Pons, E., Roca, A., Àlvarez, M., Mañé, J., Fernández-Bañares, F., and Gassull, M. A. (2003) The effects of fish oil, olive oil, oleic acid and linoleic acid on colorectal neoplastic processes. *Clin. Nutr.* **22**, 71–79
38. Mukherjee, P. K., Marcheselli, V. L., Serhan, C. N., and Bazan, N. G. (2004) Neuroprotectin D1: a docosahexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 8491–8496
39. Baldie, G., Kaimakamis, D., Rotondo, D. (1993) Fatty acid modulation of cytokine release from human monocytic cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1179**, 125–133
40. Billiar, T. R., Bankey, P. E., Svingen, B. A., Curran, R. D., West, M. A., Holman, R. T., Simmons, R. L., and Cerra, F. B. (1988) Fatty acid intake and Kupffer cell function: fish oil alters eicosanoid and monokine production to endotoxin stimulation. *Surgery* **104**, 343–349
41. Wallace, F. A., Miles, E. A., and Calder, P. C. (2000) Activation state alters the effect of dietary fatty acids on pro-inflammatory mediator production by murine macrophages. *Cytokine* **12**, 1374–1379
42. Endres, S., Ghorbani, R., Kelley, V. E., Georgilis, K., Lonnemann, G., van der Meer, J. W., Cannon, J. G., Rogers, T. S., Klempner, M. S., Weber, P. C., *et al.* (1989) The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. *N. Engl. J. Med.* **320**, 265–271
43. Diehl, A. M. (2000) Cytokine regulation of liver injury and repair. *Immunol. Rev.* **174**, 160–171
44. Cabré, E., and Gassull, M. A. (1996) Polyunsaturated fatty acid deficiency in liver diseases: pathophysiological and clinical significance. *Nutrition* **12**, 542–548
45. Owen, J. S., Bruckdorfer, K. R., Day, R. C., and McIntyre, N. (1982) Decreased erythrocyte membrane fluidity and altered lipid composition in human liver disease. *J. Lipid Res.* **23**, 124–132
46. Owen, J. S., Hutton, R. A., Day, R. C., Bruckdorfer, K. R., and McIntyre, N. (1981) Platelet lipid composition and platelet aggregation in human liver disease. *J. Lipid Res.* **22**, 423–430
47. Thomas, E. L., Taylor-Robinson, S. D., Barnard, M. L., Frost, G., Sargentoni, J., Davidson, B. R., Cunnane, S. C., and Bell, J. D. (1997) Changes in adipose tissue composition in malnourished patients before and after liver transplantation: a carbon-13 magnetic resonance spectroscopy and gas-liquid chromatography study. *Hepatology* **25**, 178–183
48. Miyamoto, A., Wakabayashi, H., and Watanabe, A. (1997) Abnormality in fatty acid composition of gastric mucosal phospholipids in patients with liver cirrhosis and its correction with a polyunsaturated fatty acid-enriched soft oil capsule. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **12**, 644–652
49. Watanabe, A., Saito, S., Tsuchida, T., Higuchi, K., and Okita, M. (1999) Low plasma levels of docosahexaenoic acid in patients with liver cirrhosis and its correction with a polyunsaturated fatty acid-enriched soft oil capsule. *Nutrition* **15**, 284–288
50. Cabré, E., and Gassull, M. A. (1999) Feeding long-chain PUFA to advanced cirrhotics: is it worthwhile? *Nutrition* **15**, 322–324

Received for publication April 20, 2006.

Accepted for publication July 6, 2006.

II.- ARTÍCULO 2

Los ácidos grasos omega-3 reducen la resistencia a la insulina y la esteatosis hepática asociadas a la obesidad: papel de las resolvinas y protectinas.

1.- Los ratones *ob/ob* presentaron obesidad y alteraciones bioquímicas severas

Este estudio fue realizado en la cepa de ratones *ob/ob* deficientes en leptina, un modelo experimental de resistencia a la insulina y esteatosis hepática asociadas a la obesidad. Los análisis revelaron que estos ratones presentaban un mayor peso corporal, hepático y de grasa epididimal, así como mayores niveles séricos de colesterol y actividad ALT respecto a los ratones *wild-type*.

2.- Los ácidos grasos omega-3 atenuaron la esteatosis hepática en los ratones *ob/ob*.

El análisis histomorfométrico de secciones hepáticas teñidas con Oil Red-O y la cuantificación del contenido hepático de TG reveló que los ratones *ob/ob* desarrollan esteatosis hepática. También observamos que esta patología progresaba con la edad. La administración durante 5 semanas de una dieta enriquecida con ácidos grasos omega-3 disminuyó significativamente el grado de esteatosis hepática en estos ratones. Este efecto antiesteatótico se asoció con cambios en la expresión de genes que controlan la lipogénesis y la oxidación de ácidos grasos en el hígado. Concretamente, los ácidos grasos omega-3 disminuyeron la expresión de la enzima lipogénica FASN, y aumentaron la de PPAR α , que controla la oxidación de los ácidos grasos. En cambio la expresión de SREBP-1c y SCD-1 se mantuvieron invariables.

3.- La expresión de adiponectina aumentó en el tejido adiposo de los ratones *ob/ob* alimentados con ácidos grasos omega-3.

El tejido adiposo juega un papel muy importante en la regulación de la resistencia a la insulina y el desarrollo del hígado graso. Dado que las interacciones entre el tejido adiposo, la resistencia a la insulina y la esteatosis hepática son llevadas a cabo por las adipoquinas, investigamos el efecto de los ácidos grasos omega-3 sobre algunas adipoquinas importantes por su papel en la regulación de la sensibilidad a la insulina y la esteatosis hepática. Los niveles de expresión del RNAm y el marcaje inmunofluorescente de la adiponectina, una adipoquina con potentes efectos antidiabéticos, antiesteatóticos y antiinflamatorios fueron significativamente mayores en el tejido adiposo de los ratones *ob/ob* alimentados con ácidos grasos omega-3. En cambio, no hubo cambios en otras adipoquinas proinflamatorias como MCP-1, TNF- α e IL-6.

4.- Una dieta enriquecida con ácidos grasos omega-3 aumentó la expresión de genes sensibilizadores a la insulina en el tejido adiposo y el hígado de los ratones *ob/ob*.

El incremento de la expresión de adiponectina en los ratones alimentados con ácidos grasos omega-3, se asoció con una mayor expresión de PPAR γ , un receptor nuclear que controla la sensibilidad a la insulina, la proteína IRS-1, que participa en la vía de señalización del receptor de la insulina, y el transportador de glucosa GLUT-4 en el tejido adiposo. Los ácidos grasos omega-3 también indujeron la expresión de PPAR γ , IRS-2 y GLUT-2 en el hígado de estos ratones.

5.- El DHA mejoró la tolerancia a la insulina en los ratones *ob/ob*.

Para confirmar a nivel funcional los efectos sensibilizadores a la insulina de los ácidos grasos omega-3, realizamos ITT en ratones *ob/ob* tratados con vehículo o con DHA. Como era

de esperar, en comparación con ratones *wild-type*, los ratones obesos mostraron una pronunciada disminución de la sensibilidad a la insulina. De acuerdo con los resultados previos en este estudio, la administración de DHA mejoró de manera considerable la sensibilidad a la insulina en los ratones *ob/ob*.

6.- El DHA activó la proteína AMPK en los ratones *ob/ob*.

Dado que la proteína AMPK es un sensor importante del estado energético del organismo que responde rápidamente a los aumentos de AMPc en las células, se examinó el efecto de los ácidos grasos omega-3 sobre la actividad de AMPK, midiendo los niveles de AMPK total y AMPK fosforilada mediante Western blot. El DHA incrementó significativamente los niveles de AMPK fosforilada respecto a los de AMPK total en el tejido adiposo y el músculo de los ratones *ob/ob*, aunque no en el hígado.

7.- Los ácidos grasos omega-3 incrementaron la formación de resolvinas y protectinas e inhibieron la formación de eicosanoides derivados de los ácidos omega-6 en el tejido adiposo de los ratones *ob/ob*.

Quisimos monitorizar por GC/MS/MS la formación de mediadores lipídicos bioactivos derivados de los ácidos grasos omega-3 y de eicosanoides derivados del AA en el tejido adiposo de los ratones *ob/ob* alimentados con una dieta enriquecida con ácidos grasos omega-3. Este análisis lipídico reveló que en condiciones normales los ratones *ob/ob* presentaban, en su tejido adiposo, niveles significativos de 17-HDHA, RvD1 y PD1, además de eicosanoides derivados del ácido graso omega-6 AA formados a través de las vías de la COX-2 y la LO. Sorprendentemente, los productos de la 12/15-LO eran los eicosanoides más abundantes en el tejido adiposo de estos animales.

La dieta enriquecida en ácidos grasos omega-3 aumentó la formación de 17-HDHA, RvD1 y PD1, a la vez que inhibió que formación endógena de derivados proinflamatorios del AA en el tejido adiposo de los ratones *ob/ob*.

8.- RvE1 y PD1 reprodujeron los efectos beneficiosos de sus precursores omega-3 sobre la resistencia a la insulina y la esteatosis hepática.

Realizamos una serie de experimentos utilizando RvE1 y PD1, los miembros más representativos de la familia de mediadores lipídicos bioactivos derivados de EPA y DHA, y observamos como estas moléculas imitaban los efectos beneficiosos obtenidos con la administración de una dieta enriquecida con ácidos grasos omega-3. La administración intraperitoneal de RvE1 a ratones *ob/ob* protegió significativamente a estos animales de la esteatosis hepática, disminuyó los niveles séricos de ALT y redujo el marcaje inmunohistoquímico de F4/80, un antígeno de superficie específico de macrófagos. Sin embargo, dado que el anticuerpo monoclonal contra F4/80 que usamos no permite discernir entre los macrófagos reclutados y los residentes, no pudimos establecer si RvE1 inhibía la infiltración de macrófagos o bien afectaba a la viabilidad de las células de Kupffer.

Por otro lado, RvE1 demostró un potente efecto sensibilizador a la insulina, induciendo la expresión génica de adiponectina, GLUT-4, IRS-1 y PPAR γ en el tejido adiposo de los ratones *ob/ob*.

Además, la incubación de explantes de tejido adiposo de ratones *ob/ob* con PD1 provocó un aumento de expresión de adiponectina similar al de la rosiglitazona, un fármaco antidiabético de la familia de las glitazonas.

Estos resultados coincidían con los obtenidos con la administración de una dieta enriquecida con ácidos grasos omega-3 en ratones *ob/ob*, y por tanto apuntaban que los efectos beneficiosos de los ácidos grasos omega-3 sobre la resistencia a la insulina y la esteatosis

hepática asociadas a la obesidad estaban mediados, al menos en parte, por estos potentes mediadores lipídicos bioactivos derivados de los ácidos grasos omega-3.

Obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis are alleviated by ω -3 fatty acids: a role for resolvins and protectins

Ana González-Pérez,* Raquel Horrillo,* Natàlia Ferré,* Karsten Gronert,[‡] Baiyan Dong,[‡] Eva Morán-Salvador,* Esther Titos,* Marcos Martínez-Clemente,* Marta López-Parra,* Vicente Arroyo,[†] and Joan Clària^{*·1}

*Department of Biochemistry and Molecular Genetics and [†]Liver Unit, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi I Sunyer, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas, University of Barcelona, Barcelona, Spain; and [‡]Center for Eye Disease and Development, School of Optometry, University of California, Berkeley, California, USA

ABSTRACT Omega-3-polyunsaturated fatty acids (ω -3-PUFAs) have well-documented protective effects that are attributed not only to eicosanoid inhibition but also to the formation of novel biologically active lipid mediators (*i.e.*, resolvins and protectins). In this study, we examined their effects on *ob/ob* mice, an obesity model of insulin resistance and fatty liver disease. Dietary intake of ω -3-PUFAs had insulin-sensitizing actions in adipose tissue and liver and improved insulin tolerance in obese mice. Genes involved in insulin sensitivity (PPAR γ), glucose transport (GLUT-2/GLUT-4), and insulin receptor signaling (IRS-1/IRS-2) were up-regulated by ω -3-PUFAs. Moreover, ω -3-PUFAs increased adiponectin, an anti-inflammatory and insulin-sensitizing adipokine, and induced AMPK phosphorylation, a fuel-sensing enzyme and a gatekeeper of the energy balance. Concomitantly, hepatic steatosis was alleviated by ω -3-PUFAs. A lipidomic analysis with liquid chromatography/mass spectrometry/mass spectrometry revealed that ω -3-PUFAs inhibited the formation of ω -6-PUFA-derived eicosanoids, while triggering the formation of ω -3-PUFA-derived resolvins and protectins. Moreover, representative members of these lipid mediators, namely resolvin E1 and protectin D1, mimicked the insulin-sensitizing and antisteatotic effects of ω -3-PUFAs and induced adiponectin expression to a similar extent that of rosiglitazone, a member of the thiazolidinedione family of antidiabetic drugs. Taken together, these findings uncover beneficial actions of ω -3-PUFAs and their bioactive lipid autacoids in preventing obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis.—González-Pérez, A., Horrillo, R., Ferré, N., Gronert, K., Dong, B., Morán-Salvador, E., Titos, E., Martínez-Clemente, M., López-Parra, M., Arroyo, V., Clària, J. Obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis are alleviated by ω -3 fatty acids: a role for resolvins and protectins. *FASEB J.* 23, 000–000 (2009)

Key Words: adiponectin • fatty liver disease • adipose tissue • lipid mediators

NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE (NAFLD) is rapidly becoming the most common cause of chronic liver disease (1–4). NAFLD is no longer regarded as a neutral and innocent bystander but rather as a pre-morbid condition that comprises a morphological spectrum of liver injury, ranging from simple TG accumulation in the cytoplasm of hepatocytes (steatosis) to inflammatory and hepatocellular injury (nonalcoholic steatohepatitis), which can eventually lead to fibrosis and cirrhosis (1–4). Although the pathophysiology of NAFLD is complex and not completely understood, much of this hepatic complication is driven by obesity and especially by insulin resistance in the setting of the so-called metabolic syndrome (5, 6). Not surprisingly, the prevalence of metabolic syndrome and of NAFLD in the general population are coincidental (22 and 20%, respectively), supporting the notion that NAFLD is the hepatic manifestation of the metabolic syndrome (3, 4).

White adipose tissue (WAT) plays a critical role in regulating energy homeostasis (7). Since WAT functional integrity is required for the balanced body metabolism of a healthy organism, deregulation of WAT functions, for example, in obesity, leads to the obesity-associated pathologies of the metabolic syndrome, such as dyslipidemia, glucose intolerance, insulin resistance, and NAFLD (8). In these circumstances, the contribution of WAT to insulin resistance and fatty liver is mediated to some extent by several adipocyte-derived factors, collectively known as adipokines (9). Moreover, obesity is characterized by a low-grade inflammatory state, which aggravates WAT function and associated pathologies (7, 9). Therefore, the modulation of adipokine secretion and actions and the control of the low-grade inflammatory state in WAT are two emerging targets in the prevention of obesity-related insulin resistance and fatty liver disease.

¹ Correspondence: Department of Biochemistry and Molecular Genetics, Hospital Clínic, Villarroel 170, Barcelona 08036, Spain. E-mail: jclaria@clinic.ub.es
doi: 10.1096/fj.08-125674

Omega-3 polyunsaturated fatty acids (ω -3-PUFAs), such as docosahexaenoic acid (DHA; C22:6n-3) and its precursor, eicosapentaenoic acid (EPA; C20:5n-3), are of therapeutic value for their anti-inflammatory and protective actions in a number of illnesses, such as rheumatoid arthritis, cystic fibrosis, ulcerative colitis, asthma, atherosclerosis, cancer, and cardiovascular disease (10). The beneficial actions of ω -3-PUFAs were initially believed to be mediated by a decrease in the production of classic inflammatory mediators such as arachidonic acid-derived eicosanoids and inflammatory cytokines (10). However, in recent years, ω -3-PUFAs have been demonstrated to serve as substrates for the conversion to a novel series of lipid mediators designated resolvins and protectins, which mediate the protective and beneficial actions underlying the effects of ω -3-PUFAs (11–15). Indeed, these novel ω -3-PUFA-derived lipid mediators have been shown to display potent protective actions in experimental colitis, peritonitis, brain ischemia-reperfusion, and corneal injury (16–19). Of particular interest is resolvin E1, a representative member of these novel lipid autacoids, which is the most effective drug candidate of the growing family of endogenous resolvins and the compound with the most developed biology (14–17).

In a recent study (20), we demonstrated that ω -3-PUFAs and their bioactive derived lipid mediators exert protective actions in the liver by preventing necroinflammatory injury in this organ. The current study was aimed to specifically explore whether ω -3-PUFAs can alter adipose tissue function and protect the liver from insulin resistance and hepatic steatosis in a murine model of obesity. In addition, with lipidomic analysis, we characterized the profile of eicosanoids and ω -3-PUFA-derived lipid mediators generated in WAT and tested the direct effects *in vivo* and *ex vivo* of the ω -3-PUFA-derived lipid autacoids, resolvins, and protectins.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Male *ob/ob* mice (B6.V-Lep^{ob}/J) were from Charles River (Saint Aubin les Elseuf, France). Deuterated leukotriene B₄ (LTB₄), synthetic DHA, resolvin E1, and rosiglitazone were purchased from Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA). Ketamine (Ketolar) and xylazine (Rompun) were from Parke Davis-Pfizer (Dublin, Ireland) and Bayer (Leverkusen, Germany), respectively. Optimal cutting temperature (OCT) compound and OCT cryomolds were purchased from Sakura Finetek (Tokyo, Japan). The Micro BCA protein assay kit was from Pierce (Rockford, IL, USA); 40% acrylamide/bis and polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes were from Bio-Rad (Hercules, CA, USA). The ECL detection system was from GE Healthcare (Chalfont St. Giles, UK). The high-capacity cDNA archive kit and TaqMan expression assays were from Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). Primary antibodies against AMPK and phospho-AMPK, F4/80, and adiponectin were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA), Serotec (Oxford, UK), and Abcam (Cambridge, UK), respectively. The Vectastain ABC kit was from Vector (Burlingame, CA, USA). Alexa Fluor 488 secondary antibody

and ProLong Gold reagent with DAPI were from Molecular Probes (Eugene, OR, USA). All other reagents were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA).

Animal studies

Male *ob/ob* and wild-type mice were housed in plastic cages on wood-chip bedding and provided free access to water and standard mouse chow AIN-93G, which is the growth diet recommended by the American Institute of Nutrition (21) for an acclimation period of 1 wk. Subsequently, *ob/ob* mice were assigned to two groups that were fed either a control diet (control group; $n=8$) or an ω -3-PUFA-enriched diet (experimental group; $n=16$) for 5 wk. These two diets had an equivalent amount of fat (8.4% fat by weight) compared to the standard mouse chow (7.2% fat by weight), but in the experimental group, 6% of the total lipid content was provided by ω -3-PUFAs. Fatty acids were incorporated into a base fabricated diet composed of starch, sucrose, cellulose, casein, L-cystine, lipids, salt mixture, vitamin mixture, and choline bitartrate as described previously (20). This diet has been used previously as a dietary ω -3-PUFA supplement in different animal models of disease (22, 23). Diets were stored at -20°C and provided fresh daily. Body weight and food intake were monitored throughout the study. Two additional groups of *ob/ob* mice ($n=10$) and their respective controls ($n=10$) received intraperitoneal injections of DHA at a dose of 4 $\mu\text{g/g}$ body weight every 12 h during 4 d (see below) or resolvin E1 at a dose of 1.2 ng/g body weight every 24 h during 4 d. At the end of the intervention periods, the mice were anesthetized under a mixture of 0.1 mg ketamine/g body weight and 0.01 mg xylazine/g body weight *via* intraperitoneal injection. Blood was collected, and serum was obtained by centrifugation at 3000 g for 10 min. Liver was excised, rinsed in Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS), fixed in 10% formalin, and embedded in paraffin or placed in OCT, immersed in cold 2-methylbutane on dry ice, and kept at -80°C . Adipose tissue was fixed in 10% formalin and embedded in paraffin. In addition, portions of liver, adipose, and muscle tissues were snap-frozen in liquid nitrogen for further analysis. All experimental studies were conducted in accordance with the criteria of the Investigation and Ethics Committee of the Hospital Clinic and the European Community laws governing the use of experimental animals.

Analysis of hepatic lipid content by Oil Red O staining

OCT-embedded liver samples were cut at 5 μm sections and stained with Oil Red O to evaluate the hepatic lipid content as described previously (24). Briefly, cryosections were fixed in 60% isopropanol for 10 min and stained with 0.3% Oil Red O in 60% isopropanol for 30 min and subsequently washed with 60% isopropanol. Sections were counterstained with Gill's hematoxylin, washed with acetic acid solution (4%), and mounted with aqueous solution. Sections were visualized under a Nikon Eclipse E600 microscope (Nikon, Kawasaki, Japan) at $\times 100$, and relative areas of steatosis (expressed as percentage Oil Red O staining) were quantified by histomorphometry using a computerized image analysis system (AnalySIS; Soft Imaging System, Munster, Germany). A minimum of 20 independent fields per sample was evaluated.

Detection of F4/80 by immunohistochemistry

Liver paraffin sections were deparaffinized, rehydrated, and pretreated with 0.05% trypsin/0.1% CaCl_2 for 20 min at 37°C to unmask the antigen, followed by incubation with 3% H_2O_2 for 25 min at room temperature and dark conditions to block

endogenous peroxidase activity and 2% BSA for 20 min at room temperature to avoid unspecific binding of the primary antibody. The sections were then incubated overnight at 4°C with the primary rat anti-mouse F4/80 antibody (1:100), followed by incubation for 90 min at room temperature with a biotinylated rabbit anti-rat IgG secondary antibody (1:200) and incubation with ABC for 45 min at room temperature. Color was developed using the DAB substrate, and sections were counterstained with hematoxylin.

Detection of adiponectin by immunofluorescence

Sections of adipose tissue were deparaffinized, rehydrated, and pretreated with 0.05% trypsin/0.1% CaCl₂ for 20 min at 37°C to unmask the antigen, followed by incubation with 2% BSA for 20 min at room temperature to avoid unspecific binding of the primary antibody. The sections were then incubated overnight at 4°C with the primary rabbit anti-adiponectin antibody (1:500), followed by incubation for 90 min at room temperature with a donkey anti-rabbit Alexa Fluor488 secondary antibody (1:400). Samples were mounted using ProLong Gold Reagent with DAPI and visualized under a Leica DMI 6000 fluorescence microscope using the software LAS AF (Leica Microsystems, Solms, Germany).

Insulin tolerance tests (ITTs)

Similar to previous studies in *ob/ob* mice (25) to evaluate the effects of ω-3-PUFAs on glucose homeostasis, we performed ITT curves in 5 *ob/ob* mice after short-term intraperitoneal injections (4 μg/g body weight, every 12 h during 4 d) of DHA, the most representative ω-3-PUFA in our diet. DHA was complexed with BSA as described elsewhere (26). Wild-type mice (*n*=4) and a placebo group of *ob/ob* mice (*n*=5) received saline. Subsequently, mice received an intraperitoneal injection of recombinant insulin (0.0075 U/g body weight), and blood samples were collected from the tail 0, 15, 30, 45, and 60 min later for serum glucose determination using the Accu-Chek Aviva system (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). At the end of the experiment, tissue samples were collected and snap-frozen in liquid nitrogen for further analysis.

Biochemical analyses

Serum concentrations of cholesterol, TG, and free fatty acids, as well as alanine aminotransferase (ALT) activity, were determined by standard laboratory procedures. The total hepatic content of TG was determined by standard laboratory procedures after lipid extraction with isopropyl alcohol-hex-

ane as described previously (24). Briefly, tissue samples (100 mg) were homogenized in 10 ml isopropyl alcohol-hexane mixture (3:2) and placed on an orbital shaker overnight at the maximum speed (250–300 rpm). Subsequently, 3 ml of anhydrous sodium sulfate (0.47 M) was added, and the samples were shaken again for 15 min. After centrifugation (200 *g* for 5 min), the upper phase was placed into a clean borosilicate tube, evaporated with liquid nitrogen, and resuspended in 0.5 ml of sodium cholate.

Ex vivo experiments in adipose tissue explants

Adipose tissue explants were obtained from the epididymal fat pads of *ob/ob* mice. Under sterile conditions, samples of adipose tissue were placed in a P60 plate with DPBS containing penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 mg/ml) prewarmed at 37°C. Connective tissue and blood vessels were removed by dissection before the tissue was cut into 40 mg pieces. Explants were washed with DPBS at 37°C by centrifugation during 1 min at 400 *g* to remove blood cells and pieces of tissue containing insufficient adipocytes to float. Then explants were incubated for 12 h in 12-well plates (40 mg/well) in 1 ml DMEM in the presence of vehicle (0.5% EtOH), protectin D1 (100 and 250 nM), and rosiglitazone (10 μM). Treatments were performed in duplicate. At the end of the incubation period, supernatants were collected and frozen at –80°C. Explants were placed directly into TRIzol reagent for immediate homogenization and frozen at –80°C for further RNA extraction.

Analysis of mRNA expression by real-time RT-PCR

Total liver RNA was obtained with the RNAqueous kit. Total RNA from adipose and muscle tissues was obtained with the TRIzol reagent method. RNA concentration was assessed in an ultraviolet-spectrophotometer, and its integrity was tested on a 6000 LabChip in a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). First-strand cDNA synthesis was performed by incubating 1 μg of total RNA with 2.5 μl of 10× RT buffer, 1 μl of 25× dNTPs, 2.5 μl of 10× primers, and 1.25 μl of reverse transcriptase (25 μl final volume) for 10 min at 25°C, followed by 2 h at 37°C in an MJ Research PTC-100 thermal cycler (Bio-Rad). Ready-to-use primer and probe sets predeveloped by Applied Biosystems (TaqMan Gene Expression Assays) were used to quantify adiponectin (ID: Mm00456425_m1), fatty acid synthase (FASN; ID: Mm00662319_m1), GLUT-2 (ID: Mm00446224_m1), GLUT-4 (ID: Mm00436615_m1), hormone-sensitive lipase (HSL; ID: Mm00495359_m1), interleukin-6 (IL-6; ID: Mm00446190_m1), insulin receptor substrate-1 (IRS-1; ID: Mm01278327_m1), IRS-2 (ID:

TABLE 1. Body, liver, and epididymal fat weight and serum biochemistry values in wild-type mice and *ob/ob* mice receiving either control or ω-3-PUFA-enriched diets

Parameter	Wild-type (<i>n</i> = 5)	<i>ob/ob</i> control diet (<i>n</i> =8)	<i>ob/ob</i> ω-3 diet (<i>n</i> =16)
Body weight (g)	27.3 ± 0.21	43.4 ± 1.8***	41.9 ± 0.5**
Liver weight (g)	1.24 ± 0.04	2.66 ± 0.24***	2.56 ± 0.11**
Liver/body weight ratio (%)	4.55 ± 0.22	6.06 ± 0.35**	6.07 ± 0.22**
Epididymal fat weight (g)	0.32 ± 0.01	3.13 ± 0.19***	2.90 ± 0.08**
Epididymal fat/body weight ratio (%)	1.18 ± 0.07	7.27 ± 0.35***	6.91 ± 0.20**
Serum cholesterol (mg/dl)	81.6 ± 3.4	180.7 ± 4.6***	151.6 ± 6.8***.†
Serum TG (mg/dl)	95.0 ± 5.0	60.57 ± 8.1*	56.5 ± 4.1*
Serum ALT (U/L)	33.5 ± 3.4	173.6 ± 31.1*	156.6 ± 15.4*
Serum FFA (μM)	ND	1811.0 ± 223.6	1406.2 ± 183.3

Data are expressed as means ± SE. FFA, free fatty acids; ND, not determined. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001 vs. wild-type. †*P* < 0.005 vs. control diet group.

Mm03038438_m1), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1; ID: Mm00441242_m1), peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR α ; ID: Mm00440939_m1), PPAR γ (ID: Mm00440945_m1), resistin (ID: Mm00445641_m1), stearyl-CoA-desaturase-1 (SCD-1; ID: Mm00772290_m1), sterol response element-binding protein-1c (SREBP-1c; ID: Mm00550338_m1), and tumor necrosis factor- α (TNF- α ; ID: Mm00443258_m1) gene expression using β -actin (ID: Mm00607939_s1) as an endogenous control. Briefly, PCR reactions were performed in duplicate using the Universal TaqMan 2 \times PCR mastermix in a volume of 20 μ l containing 1.25 μ l cDNA. Real-time quantitative PCR was performed with an ABI Prism 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems) using the fluorescent TaqMan methodology. Real-time PCR results were analyzed with the Sequence Detector Software version 2.1 (Applied Biosystems). Relative quantitation of gene expression was performed using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.

Analysis of AMP-activated protein kinase (AMPK) and phospho-AMPK protein expression by Western blot

Total proteins from liver and muscle tissues were extracted in homogenizing buffer containing 2 mM EGTA, 5 mM EDTA,

30 mM sodium fluoride, 10 mM sodium pyrophosphate decahydrate, 2 mM sodium orthovanadate, 40 mM β -glycerol phosphate, 0.5% Igepal, 20 mM MOPS, and protease inhibitors. For adipose tissue, the homogenizing buffer contained 50 mM HEPES, 20 mM β -glycerol, 2 mM EDTA, 1% Igepal, 10% glycerol, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 150 mM NaCl, 10 mM sodium fluoride, 20 mM sodium pyrophosphate decahydrate, 2 mM sodium orthovanadate, and protease inhibitors. Tissue homogenates were incubated on ice for 15 min with frequent vortexing. Thereafter, homogenates were centrifuged at 16,100 *g* for 20 min at 4°C, and the supernatants were collected. AMPK and phospho-AMPK protein expression was analyzed by Western blot. Equal quantities of total protein (50 μ g liver, 80 μ g adipose tissue and 100 μ g muscle tissue, determined by the Micro BCA protein assay kit) were resuspended in SDS-containing Laemmli sample buffer, heated for 5 min at 95°C, and separated by SDS-PAGE (12.5% for liver and muscle and 10% for adipose tissue). Proteins were electroblotted for 120 min at 100 V at 4°C onto PVDF membranes, and the efficiency of the transfer was visualized by Ponceau S solution staining. Membranes were then soaked for 1 h at room temperature in TBS (20 mM Tris-HCl, pH 7.4,

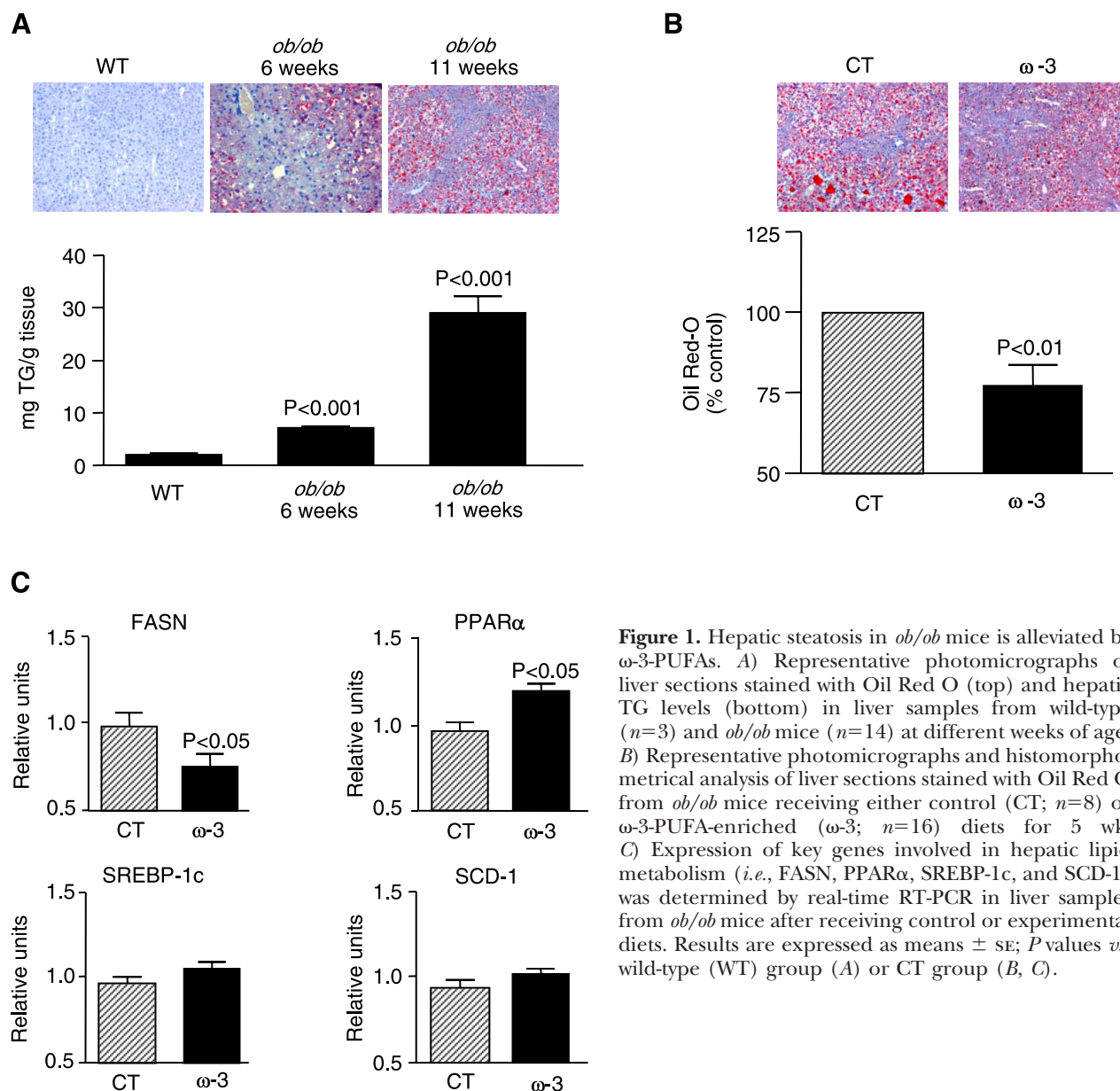


Figure 1. Hepatic steatosis in *ob/ob* mice is alleviated by ω -3-PUFAs. *A*) Representative photomicrographs of liver sections stained with Oil Red O (top) and hepatic TG levels (bottom) in liver samples from wild-type ($n=3$) and *ob/ob* mice ($n=14$) at different weeks of age. *B*) Representative photomicrographs and histomorphometrical analysis of liver sections stained with Oil Red O from *ob/ob* mice receiving either control (CT; $n=8$) or ω -3-PUFA-enriched (ω -3; $n=16$) diets for 5 wk. *C*) Expression of key genes involved in hepatic lipid metabolism (*i.e.*, FASN, PPAR α , SREBP-1c, and SCD-1) was determined by real-time RT-PCR in liver samples from *ob/ob* mice after receiving control or experimental diets. Results are expressed as means \pm SE; *P* values *vs.* wild-type (WT) group (*A*) or CT group (*B*, *C*).

and 0.5 M NaCl) containing 0.1% (v/v) Tween 20 (0.1% T-TBS) and 5% (w/v) nonfat dry milk. Blots were washed 3 times for 5 min each with 0.1% T-TBS and subsequently treated overnight at 4°C with primary rabbit anti-mouse antibodies against AMPK and phospho-AMPK (dilution 1:1000) in 0.1% T-TBS containing 5% BSA. After the blots were washed 3 times for 5 min each with 0.1% T-TBS, membranes were incubated for 1 h at room temperature with a horseradish-peroxidase-linked donkey anti-rabbit antibody (dilution 1:2000) in 0.1% T-TBS, and bands were visualized using an ECL detection system.

Lipidomic analysis by liquid chromatography/mass spectrometry/mass spectrometry (LC/MS/MS)

Adipose tissue samples (0.1 to 0.2 g) were placed in methanol/water (5 ml, 65:35, v/v, 4°C), and deuterated LTB₄ (200 pg) was added as an internal standard. Samples were gently homogenized at 4°C with an Ultra-Turrax T 25 Basic homogenizer (IKA-Werke, Staufen, Germany) and extracted in Sep-Pak C18-ODS solid-phase columns as previously detailed (19, 27). In brief, homogenized liver suspensions were placed at -20°C for at least 1 h and centrifuged at 400 g for 10 min at 4°C. Supernatants were collected, brought to a final volume of 10 ml with HPLC-grade water at 4°C, acidified to pH 4.0 with HCl (1 N), transferred into syringes, and loaded onto C₁₈-silica reverse-phase cartridges. Cartridges were

washed with 10 ml of HPLC-grade water followed by hexane, and compounds were eluted in methyl formate followed by a final elution in methanol. The eluted methyl formate fraction was rapidly evaporated under a stream of nitrogen, resuspended in 100 µl of methanol, and kept at -80°C.

Endogenous levels of eicosanoids and ω-3-PUFA-derived lipid autacoids were analyzed by LC/MS/MS-based lipidomics using a triple quadrupole linear ion trap LC/MS/MS system, which consisted of a DAD-HPLC (Agilent 1200) that was directly connected to the electrospray source of a hybrid triple quadrupole/linear ion trap mass spectrometer (MDS Sciex API 3200 QTRAP, Applied Biosystems). With the use of a LUNA C18-2 minibore column, lipid autacoids were eluted with a mobile phase consisting of methanol/water/acetate (65:35:0.03, v/v/v) that was run at a linear gradient to reach 100% methanol (methanol/acetate, 100:0.03, v/v) at a 0.35 ml/flow rate. Mass spectrometry analyses were carried out in negative ion mode using multiple reaction monitoring (MRM mode) of established specific transitions (lipid maps consortium; www.lipidmaps.org; refs. 28–30): PGE₂ (351→271 *m/z*), PGF_{2α} (353→193 *m/z*), TXB₂ (369→169 *m/z*), LTB₄ (335→195 *m/z*), PD1 (359→153 *m/z*), resolvin E1 (349→195 *m/z*), RvD1 (375→141 *m/z*), 7,17-diHDHA (359/199 *m/z*), 15-HETE (319→175 *m/z*), 12-HETE (319→179 *m/z*), 5-HETE (319→115 *m/z*), and 17-HDHA (343→245 *m/z*). Linear calibration curves (1–1000 pg), LC retention times, and MRM parameters for each compound were established and optimized with synthetic stan-

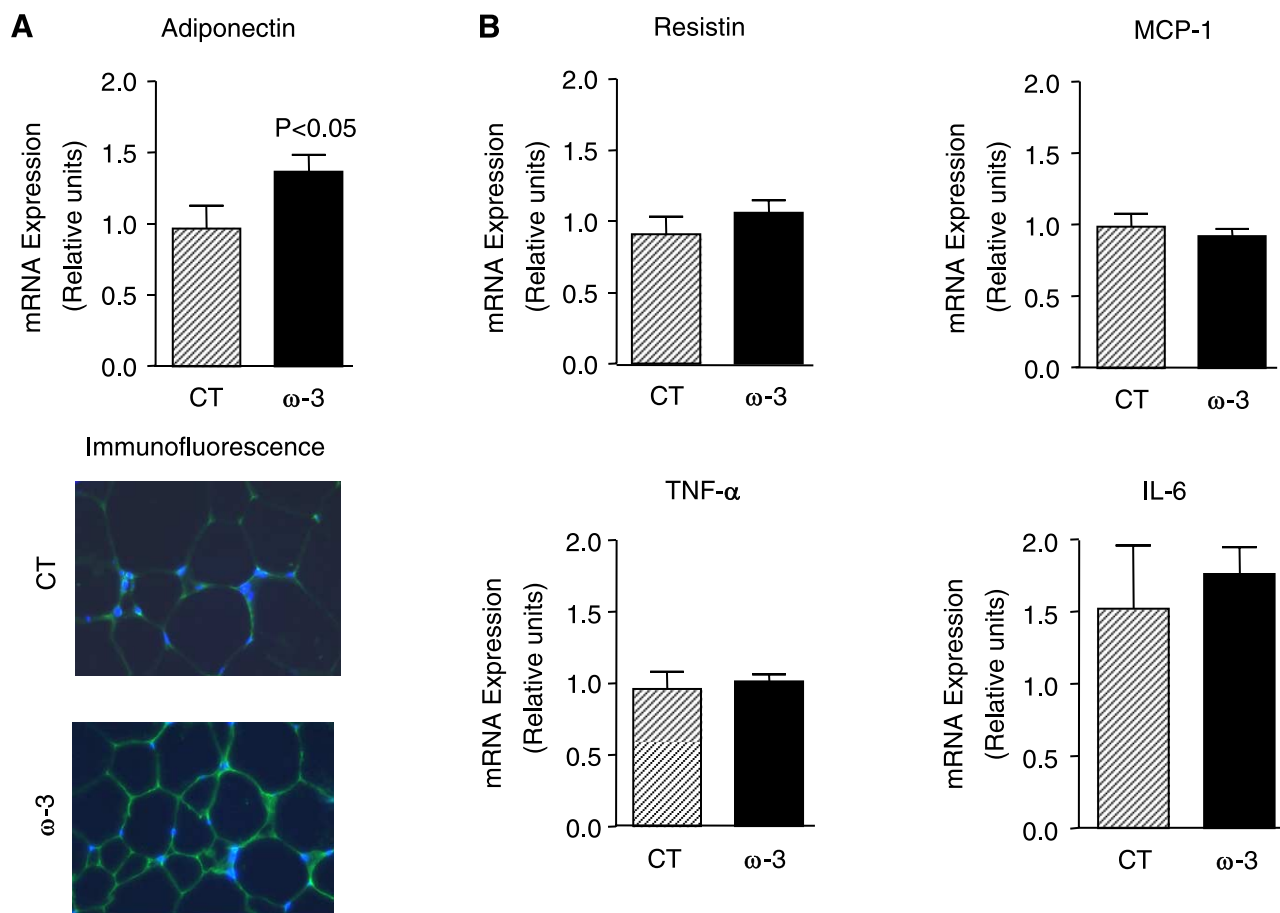


Figure 2. Effects of ω-3-PUFAs on adipokines in adipose tissue from *ob/ob* mice. *A*) Adipose tissue was obtained from *ob/ob* mice after receiving either a control diet ($n=8$) or a diet enriched with ω-3-PUFAs ($n=16$) for 5 wk. Adiponectin expression was assessed by real-time-RT-PCR, and adiponectin production was assessed by immunofluorescence labeling as described in Materials and Methods. *B*) Expression of resistin, MCP-1, TNF-α, and IL-6 was determined by real-time-RT-PCR. Results are expressed as means ± SE; *P* values vs. CT group.

dards. Concentration of the lipid autacoids was calculated based on the integrated peak area for the specific transition ions and correction for the peak area of the internal deuterated standard d_4 -LTB₄ (339→197 *m/z*).

Statistical analysis of the results was performed using the ANOVA and unpaired Student's *t* test. Results were expressed as means ± SE, and differences were considered significant at a value of *P* < 0.05.

RESULTS

The study was performed in *ob/ob* mice, an experimental model of obesity-induced insulin resistance and fatty liver disease. As described in **Table 1**, *ob/ob* mice showed increased body, liver, and epididymal fat weight; increased liver and epididymal fat-to-body weight ratios; and higher serum cholesterol levels and ALT activity with respect to wild-type mice. Serum TG levels were decreased in *ob/ob* mice (Table 1). In addition to severe obesity and hypercholesterolemia, *ob/ob* mice showed progressive hepatic steatosis, as revealed by histomorphometrical analysis of Oil Red O-stained liver sections and by the presence of increased hepatic TG content (**Fig. 1A**). The degree of hepatic

steatosis in obese *ob/ob* mice was significantly alleviated by the dietary intake of an ω-3-PUFA-enriched diet for 5 wk (**Fig. 1B**). This antisteatotic effect was associated with changes in the expression of genes governing hepatic lipogenesis and fatty acid oxidation. In fact, ω-3-PUFAs down-regulated FASN, a lipogenic factor, and up-regulated PPARα, a transcription factor that functions as a gatekeeper of fatty acid oxidation (**Fig. 1C**). The expression of SREBP-1c and SCD-1 remained unchanged (**Fig. 1C**). Mice consumed between 4.6 and 6.2 g food/d, and there were no significant differences in body, liver, and epididymal fat weight between control and experimental groups of *ob/ob* mice at the end of the intervention period (Table 1). Interestingly, serum cholesterol levels were significantly reduced in *ob/ob* mice fed an ω-3-PUFA-enriched diet (Table 1).

Adipose tissue is an important factor in the regulation of insulin resistance and fatty liver disease (8, 9). Since many of the interactions between adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis are orchestrated by soluble adipocyte-derived factors, we examined the effects of ω-3-PUFAs on selected adipokines known to participate in the regulation of insulin sensitivity and hepatic steatosis. As shown in **Fig. 2A**, the

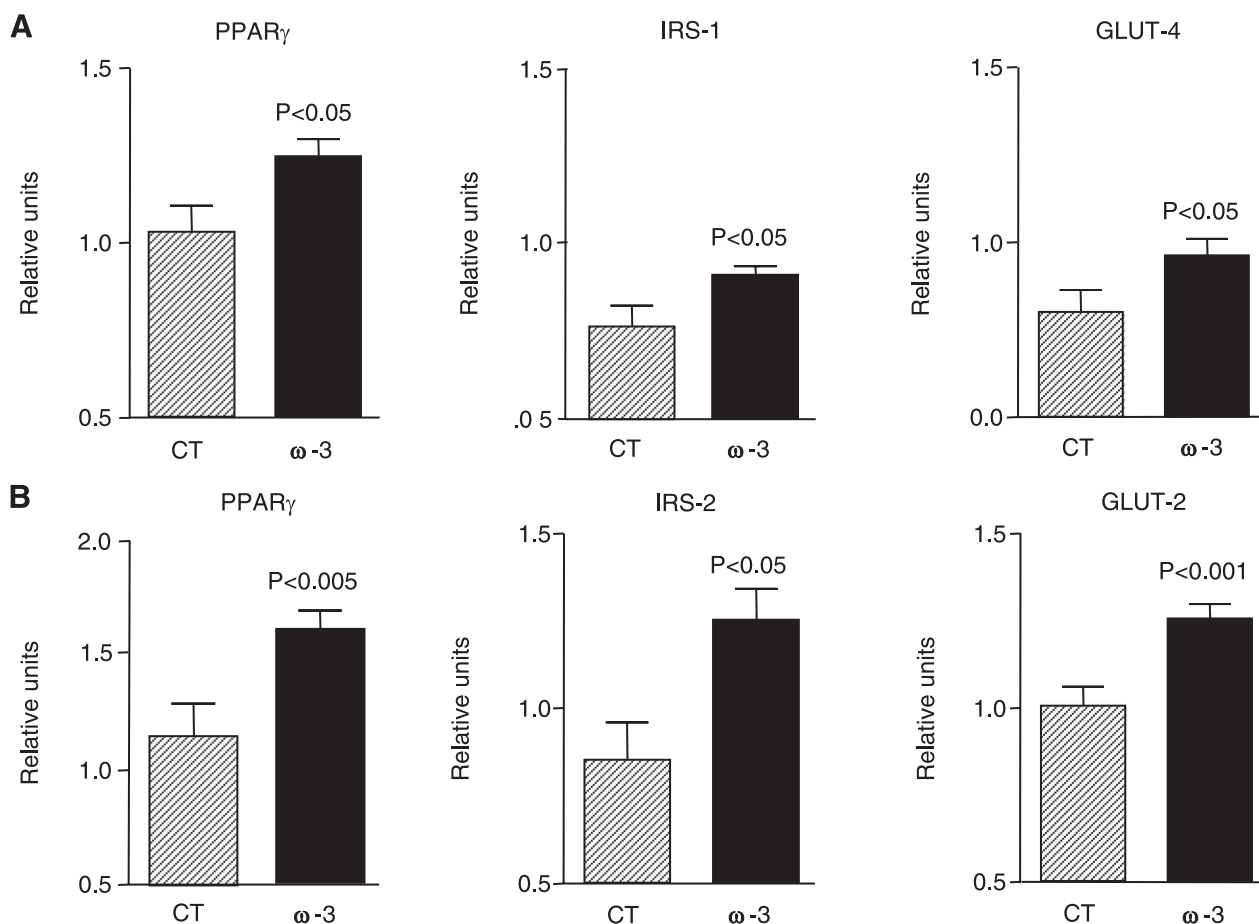


Figure 3. ω-3-PUFAs up-regulate the expression of insulin-sensitizing genes in adipose tissue and liver in *ob/ob* mice. Expression of PPAR γ , IRS-1, and GLUT-4 in adipose tissue (A) and their counterparts in the liver (*i.e.*, PPAR γ , IRS-2, and GLUT-2) (B) was determined by real-time RT-PCR in samples from *ob/ob* mice receiving either a control diet (*n*=8) or a diet enriched with ω-3-PUFAs (*n*=16). Results are expressed as means ± SE; *P* values *vs.* CT group.

mRNA expression and the immunofluorescence labeling of adiponectin, an adipokine with antidiabetic, antilipogenic, and anti-inflammatory properties, were significantly increased in adipose tissue from *ob/ob* mice receiving ω -3-PUFAs. In contrast, no changes were observed in resistin, MCP-1, TNF- α , and IL-6 (Fig. 2B). Increased adiponectin expression in mice fed ω -3-PUFAs was associated with up-regulation in the adipose tissue of insulin-sensitizing genes (*i.e.*, PPAR γ) and genes coding for insulin receptor signaling (*i.e.*, IRS-1, the substrate protein for the insulin receptor) as well as glucose transport (*i.e.*, GLUT4, the glucose transporter; Fig. 3A). Similar insulin-sensitizing actions in response to ω -3-PUFAs were observed in the liver with the induction of PPAR γ , IRS-2 and GLUT-2 expression (Fig. 3B).

To confirm the insulin-sensitizing effects of ω -3-PUFAs at the functional level, we performed ITTs in obese *ob/ob* mice. As expected, as compared with lean wild-type mice, *ob/ob* mice showed a pronounced decrease in insulin sensitivity (Fig. 4A). The administration of the ω -3-PUFA DHA markedly improved insulin sensitivity in these obese mice (Fig. 4A). Given that AMPK is a fuel-sensing enzyme that responds to changes in cellular energy state (31), we next examined the effects of ω -3-PUFAs on AMPK activity by measuring AMPK phosphorylation by Western blot. As shown in Fig. 4B, AMPK activity was significantly increased by DHA in adipose and muscle tissues from *ob/ob* mice. No changes in body, liver, and

epididymal fat weight and serum biochemistry values were noted in *ob/ob* mice receiving DHA (Table 2).

A novel family of bioactive lipid mediators has recently been uncovered (11–17). These novel ω -3-PUFA-derived autacoids, denoted resolvins and protectins, underlie most of the protective and beneficial actions of the ω -3-PUFAs (17–20). In this study, we monitored these novel lipid mediators using LC/MS/MS in samples of adipose tissue from *ob/ob* mice. As shown in Fig. 5A, the ω -3-PUFA-derived bioactive lipid mediators 17-HDHA, protectin D1, and resolvin D1 were detected under normal conditions in adipose tissue from obese mice. There were also significant levels of eicosanoids derived from the ω -6-PUFA arachidonic acid such as those produced through the cyclooxygenase [*i.e.*, prostaglandin (PG) E₂, PGF₂ α , and thromboxane (TX) B₂] and lipoxygenase pathways [5-hydroxyeicosatetraenoic acid (5-HETE), 12-HETE, and 15-HETE; Fig. 5A]. Interestingly, products derived from the 12/15-LO were among the most abundant eicosanoids in the adipose tissue (Fig. 5A). Enriching ω -3-PUFAs through diet triggered the formation of 17-HDHA as well as the levels of protectin D1 and resolvin D1 in the adipose tissue of *ob/ob* mice (Fig. 5B). In addition, endogenous formation of ω -6-PUFA-derived inflammatory mediators, including the cyclooxygenase products PGE₂, PGF₂ α , and TXB₂, the 5-LO product 5-HETE, and the 12/15-LO products 12-HETE and 15-HETE, was inhibited in *ob/ob* mice fed the ω -3-PUFA diet (Fig. 5B).

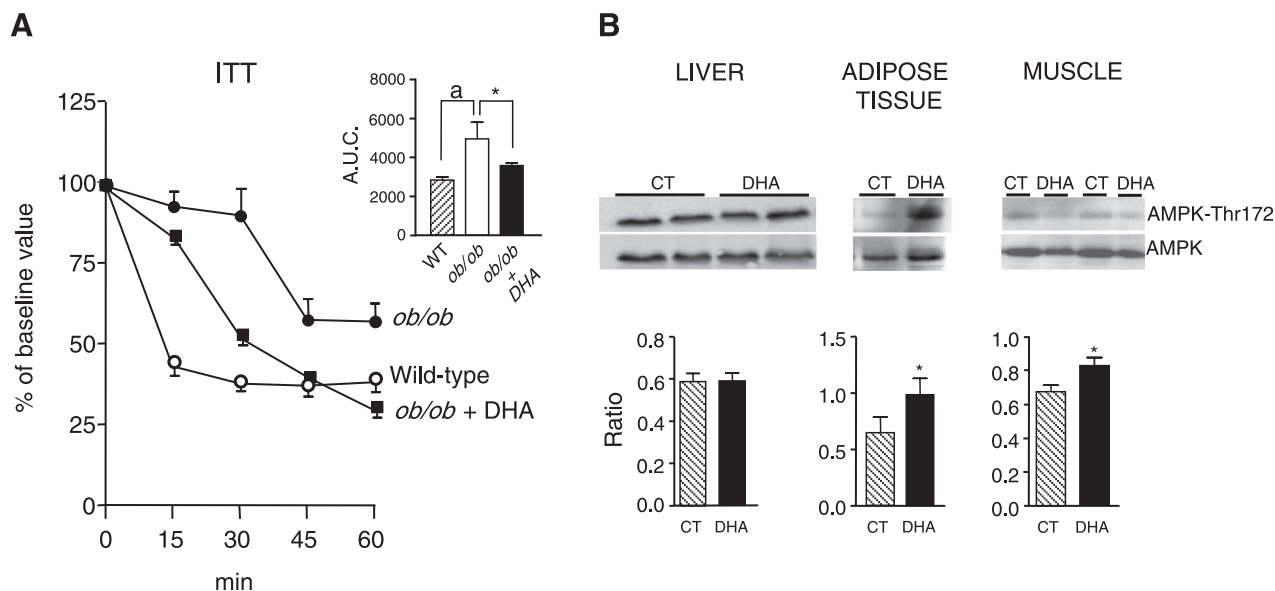


Figure 4. Effects of the ω -3-PUFA DHA on insulin tolerance and AMPK phosphorylation in *ob/ob* mice. *A*) Insulin tolerance test curves were performed in wild-type mice ($n=4$) and in *ob/ob* mice ($n=5$) receiving saline and in *ob/ob* mice receiving DHA at a dose of 4 μ g/g body weight ($n=5$) every 12 h for 4 d. Mice received an intraperitoneal injection of recombinant insulin (0.0075 U/g body weight), and blood samples were collected from the tail 0, 15, 30, 45, and 60 min later for serum glucose determination. Inset: analysis of area under the curve (AUC) for these experiments. Results are expressed as means \pm SE. ^a $P < 0.05$ vs. WT; * $P < 0.05$ vs. *ob/ob* group treated with saline. *B*) AMPK phosphorylation was determined in samples of liver, adipose, and muscle tissues obtained from control *ob/ob* mice (CT; $n=8$) and *ob/ob* mice receiving the ω -3-PUFA DHA ($n=8$). Equal quantities of total protein (50 μ g liver, 80 μ g adipose tissue, and 100 μ g muscle tissue) were separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blot. Top and bottom blots represent protein bands detected by specific anti-AMPK phosphorylated on the residue Thr172 or by specific anti-total AMPK antibodies, respectively. Densitometric analysis of the phosphorylated AMPK-to-total AMPK ratio from these blots is shown at bottom. Results are expressed as means \pm SE. * $P < 0.05$ vs. CT group.

TABLE 2. Body, liver, and epididymal fat weight and serum biochemistry values in *ob/ob* mice receiving placebo, DHA, or resolvin E1

Parameter	Placebo	DHA	Resolvin E1
Body weight (g)	38.8 ± 1.4	39.6 ± 1.2	35.1 ± 0.7
Liver weight (g)	2.64 ± 0.13	2.39 ± 0.25	2.32 ± 0.17
Liver/body weight ratio (%)	6.80 ± 0.18	5.98 ± 0.45	6.57 ± 0.40
Epididymal fat weight (g)	2.70 ± 0.21	3.09 ± 0.14	2.23 ± 0.08
Epididymal fat/body weight ratio (%)	6.88 ± 0.34	7.81 ± 0.40	6.34 ± 0.21
Serum cholesterol (mg/dl)	117.3 ± 5.2	106.0 ± 9.1	126.0 ± 6.2
Serum TAG (mg/dl)	44.4 ± 4.9	49.6 ± 8.6	33.3 ± 1.3
Serum ALT (U/L)	343.0 ± 40.9	236.0 ± 65.4	186.7 ± 11.3*
Serum FFA (μM)	2044.0 ± 142.4	1914.0 ± 125.1	1798.0 ± 130.4

Data are expressed as means ± SE; *n* = 10, *n* = 5, or *n* = 5 for placebo, DHA, and resolvin E1, respectively. **P* < 0.05 vs. placebo group.

Resolvins and protectins are bioactive lipid mediators with potent protective, anti-inflammatory, and proresolution properties (13–20). Their contribution to the regulation of lipid deposition and inflammatory cell recruit-

ment in the liver as well as their role in insulin signaling and adipokine secretion in the adipose tissue has not been investigated. As shown in Fig. 6, representative members of DHA- and EPA-derived lipid mediators, namely PD1 and resolvin E1, mimicked the beneficial actions of dietary-enriched ω-3-PUFAs in *ob/ob* mice. In fact, intraperitoneal injection of resolvin E₁ conferred significant protection against hepatic steatosis (Fig. 6A), decreased serum ALT levels, a serum marker of liver injury (Table 2), and consistently reduced hepatic F4/80 immunostaining, a macrophage marker (Fig. 6A). Since the F4/80 monoclonal antibody used in our experiments cannot distinguish between recruited and resident macrophages, our results cannot establish whether resolvin E1 decreases macrophage infiltration or this lipid mediator affects Kupffer cells, the liver resident macrophages. On the other hand, resolvin E₁ elicited significant insulin-sensitizing effects by inducing adiponectin, GLUT-4, IRS-1, and PPARγ expression in the adipose tissue (Fig. 6B). Furthermore, protectin D1 increased adiponectin expression in WAT explants from *ob/ob* mice to a similar extent as that of the insulin-sensitizing agent rosiglitazone (Fig. 6C). These findings coincide with our dietary ω-3-PUFA results and indicate that the protective effects of ω-3-PUFAs against insulin resistance and hepatic steatosis may be mediated, in part, by resolvins and protectins.

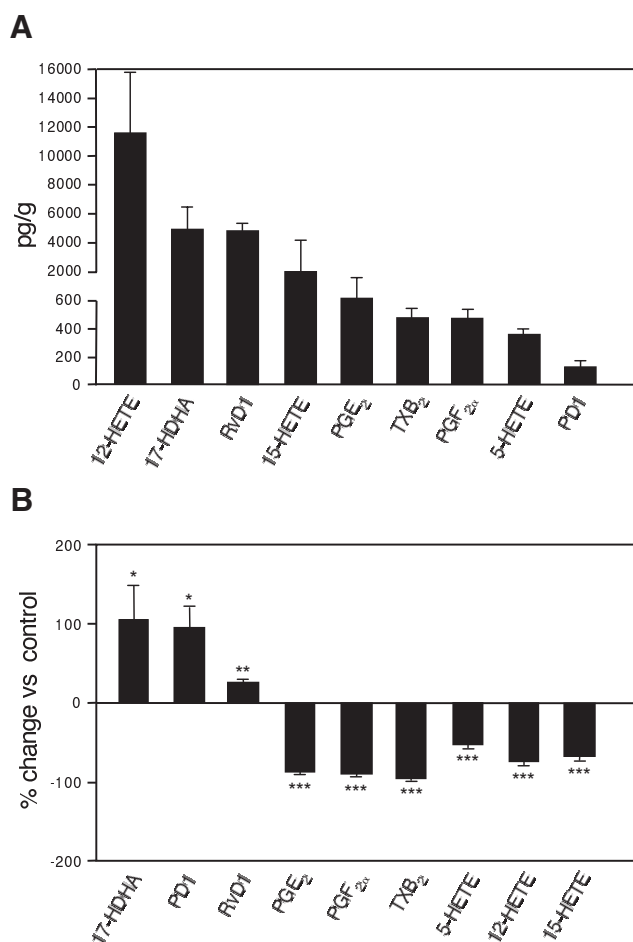


Figure 5. Lipidomic analysis of adipose tissue samples using LC/MS/MS. A) Levels of lipid mediators generated in adipose tissue of untreated *ob/ob* mice. Samples were extracted in C18-ODS solid-phase columns and analyzed by LC-MS/MS-based lipidomics (see Materials and Methods for details). B) Percentage change of tissue levels of ω-3-PUFA-derived docosanoids and ω-6-PUFA-derived eicosanoids in mice receiving ω-3-PUFA-enriched diet (*n*=8) compared to those receiving CT diet (*n*=4). Results are expressed as means ± SE. **P* < 0.05, ***P* < 0.005, ****P* < 0.0005 vs. CT group.

DISCUSSION

In the present study, we demonstrate that increased intake of ω-3-PUFAs alleviates obesity-induced insulin resistance and advanced hepatic steatosis in obese mice. These beneficial effects were associated with up-regulation of genes involved in insulin sensitivity (*i.e.*, PPARγ), glucose transport (*i.e.*, GLUT-2 and GLUT-4), and insulin receptor signaling (*i.e.*, IRS-1 and IRS-2) in both adipose tissue and liver. In addition, ω-3-PUFAs induced the expression and the production of the potent anti-inflammatory, antisteatotic, and insulin-sensitizing adipokine, adiponectin, and induced the phosphorylation of AMPK. These beneficial responses were associated with a decrease in the formation of ω-6-PUFA-derived eicosanoids (*i.e.*, PGE₂ and 5-HETE) and a concomitant increase in the generation of protective ω-3-PUFA-derived lipid me-

diators (*i.e.*, protectins and resolvins), which mimicked the insulin-sensitizing and antisteatotic effects exerted by ω -3-PUFAs. Interestingly, the effects of resolvins and protectins appeared to be more potent than their ω -3 precursors. To our knowledge, this is the first study reporting the effect of these lipid mediators on adipose tissue function and liver steatosis.

NAFLD is unique among the liver diseases because its etiology is closely related to the metabolic syndrome. Much of the increased prevalence of NAFLD is driven by obesity and especially by insulin resistance. Indeed, it has been reported that in the absence of obesity, even in patients with total lipodystrophy, insulin resistance leads to hepatic steatosis (3, 5). Although the mechanisms underlying the association of insulin resistance to hepatic steatosis remain unclear, altered insulin sensitivity has been shown to increase hepatic *de novo* lipogenesis and to induce lipolysis of adipocyte TGs and the flux of free fatty acids to the liver (7, 32). Therefore, our results showing a significant improvement in insulin tolerance test curves in obese mice treated with DHA, presumably by induction of insulin-signaling and glucose uptake components, contribute to explain the antisteatotic actions of ω -3-PUFAs. It is important to note that adipose and hepatic tissues were similarly affected by the insulin-sensitizing actions, since IRS-1 and GLUT-4 in adipose tissue and their counterparts in the liver, IRS-2 and GLUT-2, were up-regulated to a

similar extent by ω -3-PUFAs. In addition to the insulin-sensitizing actions, a significant reduction in the expression of FASN, a key enzyme in hepatic lipogenesis, was induced by ω -3-PUFAs. Moreover, ω -3-PUFAs up-regulated PPAR α , a masterpiece in the control of hepatic peroxisomal β -oxidation of fatty acids.

Altered expression of PPAR γ is a frequent finding in insulin resistance (33). PPAR γ is a member of the nuclear hormone receptor superfamily that binds to specific DNA response elements as heterodimers with the retinoid X receptor (34). PPAR γ activation results in insulin sensitization, and this nuclear factor is the cognate receptor and the established target for the thiazolidinone class of antidiabetic agents, of which rosiglitazone is a representative member (33, 34). In a previous investigation (20), we reported that ω -3-PUFAs, especially DHA and the derivative 17-HDHA, are potent PPAR γ agonists. The significance of these previous findings appears to be pertinent in the context of this study, since levels of 17-HDHA were triggered in adipose tissue after dietary supplementation of ω -3-PUFAs (Fig. 5). Taken together, these findings suggest that induction of PPAR γ expression and activation of this nuclear receptor by DHA-derived products contribute to the insulin-sensitizing actions exerted by ω -3-PUFAs. More to the point, the finding that putative metabolites of DHA are strong PPAR γ activators has stirred much interest in developing ω -3-PUFA derivatives as potent antidiabetic agents

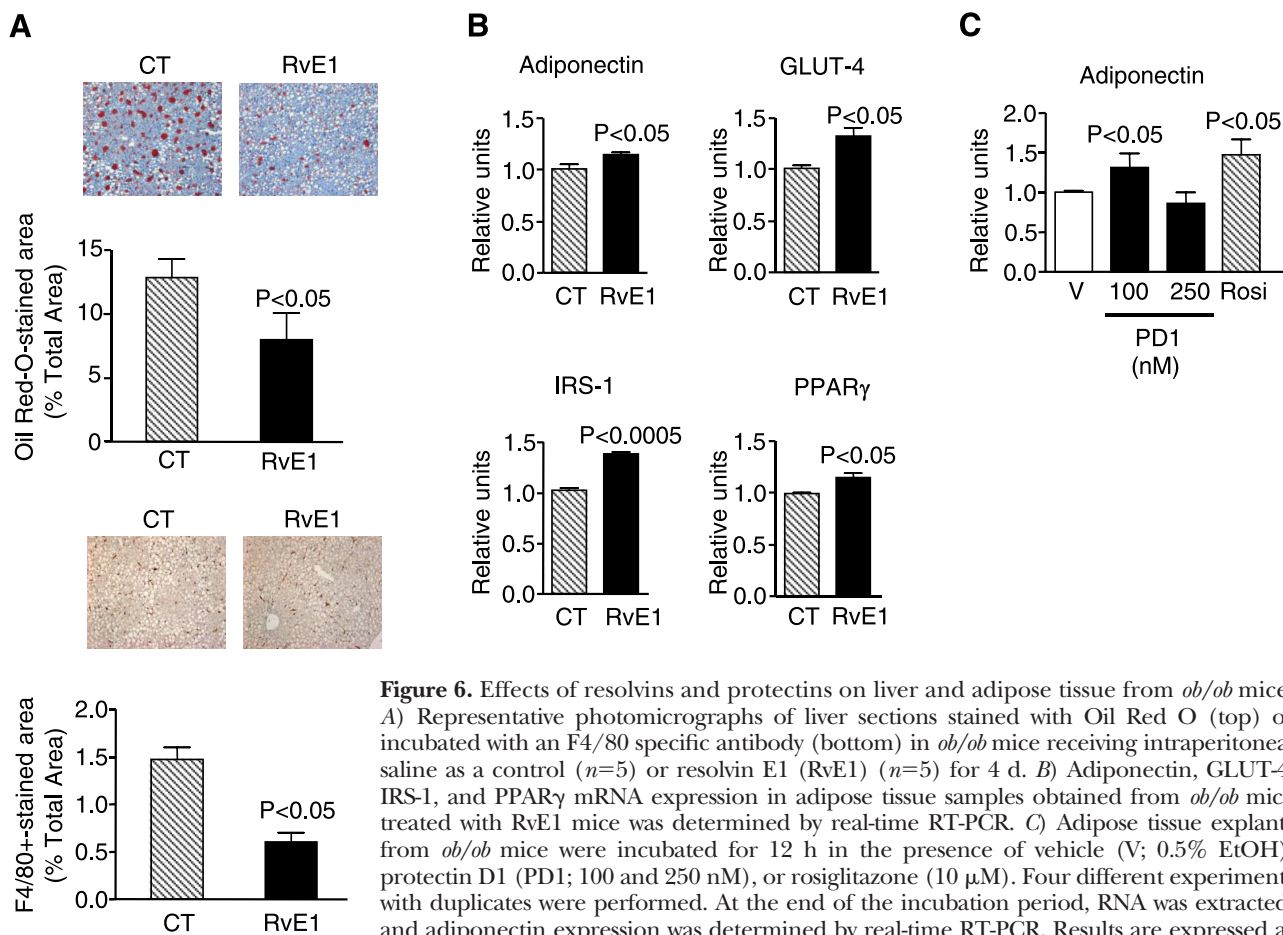


Figure 6. Effects of resolvins and protectins on liver and adipose tissue from *ob/ob* mice. *A*) Representative photomicrographs of liver sections stained with Oil Red O (top) or incubated with an F4/80 specific antibody (bottom) in *ob/ob* mice receiving intraperitoneal saline as a control ($n=5$) or resolvin E1 (RvE1) ($n=5$) for 4 d. *B*) Adiponectin, GLUT-4, IRS-1, and PPAR γ mRNA expression in adipose tissue samples obtained from *ob/ob* mice treated with RvE1 mice was determined by real-time RT-PCR. *C*) Adipose tissue explants from *ob/ob* mice were incubated for 12 h in the presence of vehicle (V; 0.5% EtOH), protectin D1 (PD1; 100 and 250 nM), or rosiglitazone (10 μ M). Four different experiments with duplicates were performed. At the end of the incubation period, RNA was extracted, and adiponectin expression was determined by real-time RT-PCR. Results are expressed as means \pm SE; *P* values *vs.* CT group (*A*, *B*) or V group (*C*).

targeting PPAR γ (35). Nevertheless, it is important to note that ω -3-PUFA-derived mediators also bind specific surface G-protein-coupled receptors. In this regard, a specific G protein-coupled receptor for resolvin E1, namely ChemR23 or CMKLR1 (chemokine-like receptor 1), has been described in mouse and human tissues (17, 36, 37). In particular, the resolvin E1 receptor is highly expressed in mouse and human adipocytes and a peptide ligand for this receptor (chemerin) has been shown to be a potent adipokine associated with obesity (38–40).

Another mechanism whereby ω -3-PUFAs may influence insulin sensitivity is by modifying the profile of adipokines secreted from adipose tissue. Among the different adipokines, adiponectin appears to be the best-characterized candidate to mediate the insulin-sensitizing effects of ω -3-PUFAs. Adiponectin is produced mainly by adipocytes and interacts with at least two different cellular receptors, the activation of which results in a reduction of insulin resistance as well as in the regulation of many biological processes including inflammation and immunity (9). In obese animals, treatment with adiponectin decreases hyperglycemia and improves insulin sensitivity (9). In the liver, adiponectin has beneficial effects in NAFLD by decreasing steatosis and liver injury and by attenuating fibrogenesis (41–43). Therefore, in our study, induction of the expression and the immunofluorescence labeling of adiponectin in adipose tissue by ω -3-PUFAs (Fig. 2) contributes to explain the insulin-sensitizing and antisteatotic effects of these compounds. Moreover, in parallel with increased adiponectin, ω -3-PUFAs induced the phosphorylation of AMPK (Fig. 4), a fuel-sensing enzyme downstream the adiponectin receptor that acts as a gatekeeper of the systemic energy balance by regulating glucose and lipid homeostasis in adipose, liver, and muscle tissues (31). AMPK responds to changes in the cellular energy state, so when the AMP-to-ATP ratio is increased this enzyme is phosphorylated and becomes active to restore the energy levels by inhibiting ATP-consuming pathways and activating ATP-producing pathways (31). Moreover, the contribution of adiponectin to insulin sensitivity appears to be mediated by a mechanism involving AMPK-dependent PPAR γ activation (44).

One of the most important findings of our study was that increased intake of ω -3-PUFAs inhibited the formation of eicosanoids derived from the ω -6-PUFA arachidonic acid (Fig. 5). Culp *et al.* (45) were the first to identify that ω -3-PUFAs reduce lipoxygenase and cyclooxygenase activities and the formation of ω -6-PUFA-derived eicosanoids. Importantly, in our study, ω -3-PUFAs reduced the formation of eicosanoids derived from 5-lipoxygenase, a major pathway of arachidonic acid metabolism recently established as a potent steatogenic factor in obese *ob/ob* mice (24). More importantly, in our investigation, inhibition of arachidonic acid-derived eicosanoids was accompanied by an increased biosynthesis of bioactive intermediaries from ω -3-PUFAs, such as 17-HDHA, resolvin D1, and protectin D1. Although we did not detect resolvin E1 in our samples because of our limits of detection, we selected this compound as a representative

member of these novel lipid mediators in subsequent studies, because it is the most effective drug candidate of the growing family of endogenous resolvins and the compound with the most developed biology (36, 46–48). These novel oxygenated products originated from ω -3-PUFAs evoke potent protective actions demonstrable at the nanomolar and picomolar ranges, many of which are related to the resolution of unremitting inflammation (12, 16–20, 36, 46–48). Given that obesity is defined as a state of low-grade inflammation (8, 9), in our study resolution of local inflammation by ω -3-PUFAs and their derived lipid mediators is likely to underlie the beneficial effects of these compounds on insulin resistance and hepatic steatosis in obese mice. Our findings are consistent with a recent study by Merched *et al.* (49) who demonstrated that a deficit in the biosynthesis of ω -3-PUFA-derived lipid autacoids is involved in the progression of atherosclerosis, a disease also closely related to the metabolic syndrome.

The results of the current study strongly support the concept that increased intake of ω -3-PUFAs would contribute to the prevention of metabolic liver disease similar to the improved outcomes reported in arthritis, cystic fibrosis, IgA nephropathy, diabetes, ulcerative colitis, Crohn's disease, asthma, and sepsis (10). Our results are consistent with previous investigations reporting that 1) essential fatty acid deficiency modulates very low density lipoprotein secretion in hepatocytes, 2) fish oil feeding decreases the propensity for hepatic TG storage, 3) PUFAs ameliorate adipose tissue inflammation in diabetic mice, and 4) PUFAs prevent fatty liver and mitochondrial dysfunction in rats fed with alcohol (50–53). The sum of the findings of the current study with results reported in the literature, together with our previous findings showing that ω -3-PUFAs reduce the incidence of necroinflammatory liver injury (20), provides a strong rationale for dietary supplementation with ω -3-PUFAs in patients with liver disease. This approach could especially have potential implications for the use of marginal steatotic liver donors, which are currently excluded because of the presence of macrovesicular steatosis (54, 55). [F]

This work was supported by a grant from the Ministerio de Educación y Ciencia (MEC; SAF 06/03191) to J.C. and by a grant from the National Eye Institute (EY01613604) to K.G. CIBERehd is funded by the Instituto de Salud Carlos III. A.G.-P. (BES-2004-5054) was supported by MEC. M.L.-P., E.T., and N.F. had contracts with Instituto de Salud Carlos III, CIBERehd, and MEC Juan de la Cierva, respectively. M.M.-C. (BES-2007-16147) and E.M.-S. (AP2007-02004) received fellowships from MEC. R.H. is supported by Generalitat de Catalunya-European Social Funds (2006FI-00091).

REFERENCES

1. Clark, J. M., Brancati, F. L., and Diehl, A. M. (2002) Nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* **122**, 1649–1657
2. Falck-Ytter, Y., Younossi, Z. M., Marchesini, G., and McCullough, A. J. (2001) Clinical features and natural history of nonalcoholic steatosis syndromes. *Semin. Liver Dis.* **21**, 17–26

3. Angulo, P. (2002) Nonalcoholic fatty liver disease. *N. Engl. J. Med.* **346**, 1221–1231
4. Sanyal, A. J. (2002) AGA technical review on nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* **123**, 1705–1725
5. Ginsberg, H. N. (2006) Is the slippery slope from steatosis to steatohepatitis paved with triglyceride or cholesterol? *Cell. Metab.* **4**, 179–181
6. Qureshi, K., and Abrams, G. A. (2007) Metabolic liver disease of obesity and role of adipose tissue in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* **13**, 3540–3553
7. Guilherme, A., Virbasius, J. V., Puri, V., and Czech, M. P. (2008) Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **9**, 367–377
8. Trayhurn, P. (2005) Endocrine and signalling role of adipose tissue: new perspectives on fat. *Acta Physiol. Scand.* **184**, 285–293
9. Tilg, H., and Moschen, A. R. (2006) Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 772–783
10. Calder, P. C. (2006) n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am. J. Clin. Nutr.* **83**, 1505S–1519S
11. Serhan, C. N., Hong, S., Gronert, K., Colgan, S. P., Devchand, P. R., Mirick, G., and Moussignac, R. L. (2002) Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. *J. Exp. Med.* **196**, 1025–1037
12. Hong, S., Gronert, K., Devchand, P. R., Moussignac, R. L., and Serhan, C. N. (2003) Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells. Autacoids in anti-inflammation. *J. Biol. Chem.* **278**, 14677–14687
13. Serhan, C. N., Gotlinger, K., Hong, S., and Arita, M. (2004) Resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins, novel omega-3-derived mediators, and their aspirin-triggered endogenous epimers: an overview of their protective roles in catabasis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **73**, 155–172
14. Serhan, C.N., Chiang, N., and Van Dyke, T.,E. (2008) Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 349–361
15. Serhan, C. N. (2007) Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annu. Rev. Immunol.* **25**, 101–137
16. Arita, M., Yoshida, M., Hong, S., Tjonahen, E., Glickman, J., Petasis, N. A., Blumberg, R. S., and Serhan, C. N. (2005) Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from omega-3 eicosapentaenoic acid, protects against 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 7671–7676
17. Arita, M., Bianchini, F., Aliberti, J., Sher, A., Chiang, N., Hong, S., Yang, R., Petasis, N. A., and Serhan, C. N. (2005) Stereochemical assignment, antiinflammatory properties, and receptor for the omega-3 lipid mediator resolvin E1. *J. Exp. Med.* **201**, 713–722
18. Marcheselli, V. L., Hong, S., Lukiw, W. J., Tian, X. H., Gronert, K., Musto, A., Hardy, M., Gimenez, J. M., Chiang, N., Serhan, C. N., and Bazan, N. G. (2003) Novel docosanoids inhibit brain ischemia-reperfusion-mediated leukocyte infiltration and proinflammatory gene expression. *J. Biol. Chem.* **278**, 43807–43817
19. Gronert, K., Maheshwari, N., Khan, N., Hassan, I. R., Dunn, M., and Laniado Schwartzman, M. (2005) A role for the mouse 12/15- lipoxygenase pathway in promoting epithelial wound healing and host defense. *J. Biol. Chem.* **280**, 15267–15278
20. González-Pérez, A., Planagumà, A., Gronert, K., Miquel, R., López-Parra, M., Titos, E., Horrillo, R., Ferré, N., Deulofeu, R., Arroyo, V., Rodés, J., and Clària, J. (2006) Docosahexaenoic acid (DHA) blunts liver injury by conversion to protective lipid mediators: protectin D1 and 17S-hydroxy-DHA. *FASEB J.* **20**, 2537–2539
21. Reeves, P. G., Nielsen, F. H., and Fahey, G.C. Jr. (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.* **123**, 1939–1951
22. Rousseau, D., Hélie-Toussaint, C., Raederstorff, D., Moreau, D., and Grynberg, A. (2001) Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids affect the development of renovascular hypertension in rats. *Mol. Cell. Biochem.* **225**, 109–119
23. Rousseau, D., Hélie-Toussaint, C., Moreau, D., Raederstorff, D., and Grynberg, A. (2003) Dietary n-3 PUFAs affect the blood pressure rise and cardiac impairments in a hyperinsulinemia rat model in vivo. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **285**, H1294–H1302
24. López-Parra, M., Titos, E., Horrillo, R., Ferré, N., González-Pérez, A., Martínez-Clemente, M., Planagumà, A., Masferrer, J. L., Arroyo, V., and Clària, J. (2008) Regulatory effects of arachidonate 5-lipoxygenase on hepatic MTP activity and VLDL-TG and ApoB secretion in obese mice. *J. Lipid. Res.* **49**, 2513–2523
25. Song, X. M., Fiedler, Galuska, M., D., Ryder, J. W., Fernström, M., Chibalin, A. V., Wallberg-Henriksson, H., and Zierath, J. R. (2002) 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside treatment improves glucose homeostasis in insulin-resistant diabetic (*ob/ob*) mice. *Diabetologia* **45**, 56–65
26. Kielar, M. L., Jeyarajah, D. R., Zhou, X. J., and Lu, C. Y. (2003) Docosahexaenoic acid ameliorates murine ischemic acute renal failure and prevents increases in mRNA abundance for both TNF-alpha and inducible nitric oxide synthase. *J. Am. Soc. Nephrol.* **14**, 389–396
27. Gronert, K., Clish, C. B., Romano, M., and Serhan, C. N. (1999) Transcellular regulation of eicosanoid biosynthesis. Transcellular regulation of eicosanoid biosynthesis. *Methods Mol. Biol.* **120**, 119–144
28. Murphy, R. C., Barkley, R. M., Zemski Berry, K., Hankin, J., Harrison, K., Johnson, C., Krank, J., McAnoy, A., Uhlson, C., and Zarini, S. (2005) Electrospray ionization and tandem mass spectrometry of eicosanoids. *Anal. Biochem.* **346**, 1–42
29. Masoodi, M., Mir, A. A., Petasis, N. A., Serhan, C. N., and Nicolaou, A. (2008) Simultaneous lipidomic analysis of three families of bioactive lipid mediators leukotrienes, resolvins, protectins and related hydroxy-fatty acids by liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **22**, 75–83
30. Serhan, C. N., Lu, Y., Hong, S., and Yang, R. (2007) Mediator lipidomics: search algorithms for eicosanoids, resolvins, and protectins. *Methods Enzymol.* **432**, 275–317
31. Long, Y. C., and Zierath, J. R. (2006) AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J. Clin. Invest.* **116**, 1776–1783
32. Yu, Y. H., and Ginsberg, H. N. (2005) Adipocyte signaling and lipid homeostasis: sequelae of insulin-resistant adipose tissue. *Circ. Res.* **96**, 1042–1052
33. Semple, R. K., Chatterjee, V. K., and O’Rahilly, S. (2006) PPAR gamma and human metabolic disease. *J. Clin. Invest.* **116**, 581–589
34. Glass, C. K. (2006) Going nuclear in metabolic and cardiovascular disease. *J. Clin. Invest.* **116**, 556–560
35. Yamamoto, K., Itoh, T., Abe, D., Shimizu, M., Kanda, T., Koyama, T., Nishikawa, M., Tamai, T., Oozumi, H., and Yamada, S. (2005) Identification of putative metabolites of docosahexaenoic acid as potent PPARgamma agonists and anti-diabetic agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **15**, 517–522
36. Campbell, E. L., Louis, N. A., Tomassetti, S. E., Canny, G. O., Arita, M., Serhan, C. N., and Colgan, S. P. (2007) Resolvin E1 promotes mucosal surface clearance of neutrophils: a new paradigm for inflammatory resolution. *FASEB J.* **21**, 3162–3170
37. Arita, M., Ohira, T., Sun, Y. P., Elangovan, S., Chiang, N., and Serhan, C. N. (2007) Resolvin E1 selectively interacts with leukotriene B4 receptor BLT1 and ChemR23 to regulate inflammation. *J. Immunol.* **178**, 3912–3917
38. Goralski, K. B., McCarthy, T. C., Hanniman, E. A., Zabel, B. A., Butcher, E. C., Parlee, S. D., Muruganandan, S., and Sinal, C. J. (2007) Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism. *J. Biol. Chem.* **282**, 28175–28188
39. Roh, S. G., Song, S. H., Choi, K. C., Katoh, K., Wittamer, V., Parmentier, M., and Sasaki, S. (2007) Chemerin—a new adipokine that modulates adipogenesis via its own receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **362**, 1013–1018
40. Bozaoglu, K., Bolton, K., McMillan, J., Zimmet, P., Jowett, J., Collier, G., Walder, K., and Segal, D. (2007) Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome. *Endocrinology* **148**, 4687–4694
41. Xu, A., Wang, Y., Keshaw, H., Xu, L. Y., Lam, K. S., and Cooper, G. J. (2003) The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J. Clin. Invest.* **112**, 91–100

42. Kamada, Y., Tamura, S., Kiso, S., Matsumoto, H., Saji, Y., Yoshida, Y., Fukui, K., Maeda, N., Nishizawa, H., Nagaretani, H., Okamoto, Y., Kihara, S., Miyagawa, J., Shinomura, Y., Funahashi, T., and Matsuzawa, Y. (2003) Enhanced carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice lacking adiponectin. *Gastroenterology* **125**, 1796–1807
43. Masaki, T., Chiba, S., Tatsukawa, H., Yasuda, T., Noguchi, H., Seike, M., and Yoshimatsu, H. (2004) Adiponectin protects LPS-induced liver injury through modulation of TNF-alpha in KK-Ay obese mice. *Hepatology* **40**, 177–184
44. Nawrocki, A. R., Rajala, M. W., Tomas, E., Pajvani, U. B., Saha, A. K., Trumbauer, M. E., Pang, Z., Chen, A. S., Ruderman, N. B., Chen, H., Rossetti, L., and Scherer, P. E. (2006) Mice lacking adiponectin show decreased hepatic insulin sensitivity and reduced responsiveness to peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J. Biol. Chem.* **281**, 2654–2660
45. Culp, B. R., Titus, B. G., and Lands, W. E. (1979) Inhibition of prostaglandin biosynthesis by eicosapentaenoic acid. *Prostaglandins Med.* **3**, 269–278
46. Connor, K. M., SanGiovanni, J. P., Lofqvist, C., Aderman, C. M., Chen, J., Higuchi, A., Hong, S., Pravda, E. A., Majchrzak, S., Carper, D., Hellstrom, A., Kang, J. X., Chew, E. Y., Salem, N. Jr., Serhan, C. N., and Smith, L. E. (2007) Increased dietary intake of omega-3-polyunsaturated fatty acids reduces pathological retinal angiogenesis. *Nat. Med.* **13**, 868–873
47. Haworth, O., Cernadas, M., Yang, R., Serhan, C. N., and Levy, B. D. (2008) Resolvin E1 regulates interleukin 23, interferon-gamma and lipoxin A4 to promote the resolution of allergic airway inflammation. *Nat. Immunol.* **9**, 873–879
48. Schwab, J. M., Chiang, N., Arita, M., and Serhan, C. N. (2007) Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature* **447**, 869–874
49. Merched, A. J., Ko, K., Gotlinger, K. H., Serhan, C. N., and Chan, L. (2008) Atherosclerosis: evidence for impairment of resolution of vascular inflammation governed by specific lipid mediators. *FASEB J.* **22**, 3595–3606
50. Werner, A., Havinga, R., Bos, T., Bloks, V. W., Kuipers, F., and Verkade, H. J. (2005) Essential fatty acid deficiency in mice is associated with hepatic steatosis and secretion of large VLDL particles. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **288**, G1150–1158
51. Levy, J. R., Clore, J. N., and Stevens, W. (2004) Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids decrease hepatic triglycerides in Fischer 344 rats. *Hepatology* **39**, 608–616
52. Todoric, J., Löffler, M., Huber, J., Bilban, M., Reimers, M., Kadl, A., Zeyda, M., Waldhäusl, W., and Stulnig, T. M. (2006) Adipose tissue inflammation induced by high-fat diet in obese diabetic mice is prevented by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Diabetologia* **49**, 2109–2119
53. Song, B. J., Moon, K. H., Olsson, N. U., and Salem, N. Jr. (2008) Prevention of alcoholic fatty liver and mitochondrial dysfunction in the rat by long-chain polyunsaturated fatty acids. *J. Hepatol.* **49**, 262–273
54. Alwayn, I. P., Andersson, C., Zauscher, B., Gura, K., Nosé, V., and Puder, M. (2005) Omega-3 fatty acids improve hepatic steatosis in a murine model: potential implications for the marginal steatotic liver donor. *Transplantation* **79**, 606–608
55. El-Badry, A. M., Moritz, W., Contaldo, C., Tian, Y., Graf, R., Clavien, P. A. (2007) Prevention of reperfusion injury and microcirculatory failure in macrosteatotic mouse liver by omega-3 fatty acids. *Hepatology* **45**, 855–863

Received for publication November 18, 2008.

Accepted for publication January 15, 2009.

Discusión

Al inicio de este proyecto de tesis doctoral, ya habían sido bien documentados los efectos protectores de los ácidos grasos omega-3 en varias patologías inflamatorias, como la artritis reumatoide, la fibrosis quística, la colitis ulcerosa, el asma, la aterosclerosis, el cáncer y la enfermedad cardiovascular (Calder, 2002). A pesar de ello, quisimos profundizar en los efectos de estos ácidos grasos, muy abundantes en algunos alimentos cotidianos, sobre patologías hepáticas y del tejido adiposo, como la necroinflamación, la esteatosis hepática o la resistencia a la insulina asociadas a la obesidad. Por otro lado, éste es el primer trabajo que aporta evidencias sobre la formación de los mediadores lipídicos bioactivos derivados de los ácidos grasos omega-3, denominados resolvinas y protectinas, tanto en el hígado como en el tejido adiposo, tras administrar una dieta enriquecida en ácidos grasos omega-3.

El presente trabajo demuestra que el ácido graso omega-3 DHA protege a las células hepáticas frente al daño genotóxico y el estrés oxidativo. Estos efectos hepatoprotectores están asociados con una menor formación de eicosanoides derivados del ácido graso omega-6 AA, como PGE₂, y la generación de mediadores lipídicos bioactivos derivados del DHA, como PD1 y 17S-HDHA, en el hígado de ratones tratados con CCl₄. Los efectos beneficiosos de estos derivados bioactivos del DHA se han confirmado con experimentos *in vitro*, que demuestran que 17-HDHA también ejerce efectos protectores, más potentes incluso que los de su precursor DHA, sobre los hepatocitos frente al daño genotóxico y el estrés oxidativo, y que además reduce la liberación de TNF- α y la expresión de 5-LO en macrófagos cultivados. Por tanto, estos resultados apuntan que la formación de resolvinas y protectinas es uno de los mecanismos moleculares importantes que subyacen a los efectos beneficiosos de una dieta enriquecida en ácidos grasos omega-3.

Antes del descubrimiento de las resolvinas y las protectinas, los efectos protectores de los ácidos grasos omega-3 se explicaban principalmente por sus efectos inhibitorios sobre la formación de eicosanoides proinflamatorios derivados del AA a través de las vías de COX-2 y 5-

LO, tanto por competencia como sustrato de estas enzimas, como por la inhibición de las enzimas (Bagga *et al.*, 2003; Culp *et al.*, 1979). De acuerdo con esta explicación, este trabajo demuestra que una dieta enriquecida con ácidos grasos omega-3 reduce significativamente la expresión del RNAm de COX-2 y los niveles hepáticos de PGE₂ en ratones tratados con CCl₄. Estudios previos al nuestro también han observado efectos similares de los ácidos grasos omega-3 sobre COX-2, una enzima clave para la inflamación, en pacientes con cáncer de próstata tratados con una dieta enriquecida con aceite de pescado, e *in vitro* con células condrocíticas bovinas, en células cancerosas de colon humanas incubadas con DHA o con aceite de pescado y en células de hepatoma de rata expuestas a ALA, ácido graso omega-3 precursor del resto de ácidos grasos omega-3 que existen (Vecchini *et al.*, 2004; Aronson *et al.*, 2001; Curtis *et al.*, 2000; Llor *et al.*, 2003; Narayanan *et al.*, 2003).

Trabajos previos de nuestro grupo han demostrado que en ratas tratadas con CCl₄ se produce un incremento muy marcado de la expresión de COX-2 y que la inhibición selectiva de esta enzima es capaz de prevenir la fibrosis hepática en estos animales (Planagumà *et al.*, 2005). Teniendo en cuenta estos resultados previos, la disminución de la expresión hepática de COX-2 que observamos en los ratones tratados con CCl₄ alimentados con ácidos grasos omega-3 es, probablemente, otro de los mecanismos importantes para las acciones protectoras de los ácidos grasos omega-3 en este órgano. Además, hemos podido comprobar que la reducción de la expresión hepática de COX-2 se debe a la reducción del número de células hepáticas que expresan COX-2 y no a una menor expresión génica en estas células, puesto que al incubar macrófagos con DHA y sus productos derivados no se apreció reducción en los niveles de RNAm de COX-2.

Sin duda, el resultado más importante de esta tesis doctoral es que los animales alimentados con dietas enriquecidas en ácidos grasos omega-3 presentan una mayor formación de mediadores lipídicos antiinflamatorios PD1 y 17S-HDHA, derivados del DHA. Este resultado

merece especial atención porque, aunque PD1 ya se había detectado en otros tejidos, es la primera vez que se demuestra su formación en el hígado. Esta molécula es un importante regulador de la inflamación y su formación es clave en los efectos antiinflamatorios atribuidos al DHA. Se ha demostrado que PD1 reduce la expresión génica de COX-2, bloquea la activación de NF- κ B en el hipocampo de ratón y en células neurales cultivadas (Marcheselli *et al.*, 2003) e inhibe la expresión de COX-2 inducida por IL-1 β en células epiteliales pigmentadas de la retina (Mukherjee *et al.*, 2004). Además, tanto PD1 como 17S-HDHA inhiben la expresión génica de IL-1 β inducida por TNF- α en células humanas de la microglía (Hong *et al.*, 2003).

Por otra parte, 17-HDHA, que es un marcador de activación de la vía de formación de protectinas y resolvinas D de la serie 17S- (Figuras 5 y 6), inhibe la liberación de TNF- α en macrófagos, las principales células efectoras de los eventos inflamatorios que conducen al daño hepático a través de la liberación de variedad de factores solubles, que incluye citoquinas proinflamatorias, ROS y eicosanides, tras su activación en respuesta a estímulos nocivos (Decker, 1990). Un efecto similar se ha observado en linfocitos expuestos a dosis crecientes de PD1 (Ariel *et al.*, 2005), en monocitos humanos expuestos a DHA y EPA (Baldie *et al.*, 1993), y en macrófagos murinos cultivados en presencia de aceite de pescado (Billiar *et al.*, 1988). *In vivo*, la suplementación de la dieta de voluntarios humanos o de roedores con aceite de pescado con un alto contenido en EPA y DHA también se asocia con una menor producción de TNF- α (Wallace *et al.*, 2000; Endres *et al.*, 1989). Dado que una producción aumentada de TNF- α por los macrófagos hepáticos está implicada en la patogénesis de la enfermedad hepática alcohólica y la fibrosis hepática (Diehl, 2000), la disminución de esta citoquina proinflamatoria en macrófagos tratados con 17-HDHA puede contribuir a los efectos protectores de una dieta enriquecida con ácidos grasos omega-3 en la necroinflamación hepática.

También hemos detectado una disminución en la expresión proteica de 5-LO en macrófagos tratados con 17-HDHA, resultado que concuerda con la reducción de la formación hepática de

LTB₄ en los ratones tratados con CCl₄ tras recibir una dieta enriquecida en ácidos grasos omega-3. Teniendo en cuenta que las células de Kupffer son las únicas células que expresan la vía de la 5-LO en el hígado y que nuestro grupo ha demostrado en trabajos previos que la inhibición de la vía de la 5-LO en estas células atenúa la necroinflamación y la fibrosis hepáticas (Titos *et al.*, 2005; Titos *et al.*, 2000; Titos *et al.*, 2003), estos datos suponen un mecanismo adicional para las acciones hepatoprotectoras de los ácidos grasos omega-3 y sus mediadores lipídicos derivados.

Otro resultado destacable de este trabajo es que 17-HDHA actúa como agonista de PPAR γ de manera dependiente de concentración. Curiosamente, este efecto es selectivo para la posición del grupo alcohol en el hidrox-DHA, ya que ni 17*R*-HDHA, ni 14-HDHA son capaces de activar este receptor nuclear. Aunque 7-HDHA también es un potente activador de PPAR γ , al no detectarse su formación en los hígados de los ratones alimentados con ácidos grasos omega-3, no podemos explicar el significado biológico de este resultado en el contexto del hígado. Es importante destacar que PPAR γ es considerado un factor antiinflamatorio y antifibrótico en el hígado (Planagumà *et al.*, 2005), por lo que su activación a través de los productos derivados del DHA probablemente contribuye a las acciones protectoras de las dietas enriquecidas con ácidos grasos omega-3 en este órgano.

Los resultados del primer artículo (González-Pérez *et al.*, 2006) avalan el concepto de que una dieta enriquecida con ácidos grasos omega-3 puede ser beneficiosa en pacientes con enfermedad hepática. De hecho, un rasgo común en pacientes alcohólicos y no alcohólicos con cirrosis, así como en pacientes con hepatitis aguda y la colestasis, es el déficit de ácidos grasos esenciales (Cabré *et al.*, 1996). Esta deficiencia parece ser generalizada ya que los niveles de ácidos grasos no están sólo disminuídos en el plasma y las células sanguíneas, sino también en adipocitos y la mucosa gástrica (Owen *et al.*, 1982; Owen *et al.*, 1981; Thomas *et al.*, 1997; Miyamoto *et al.*, 1997). Además, en pacientes cirróticos, se ha establecido una relación inversa

entre los niveles plasmáticos de DHA y la severidad de la enfermedad hepática (Watanabe *et al.*, 1999). No es sorprendente que la deficiencia de ácidos grasos esenciales tenga una prevalencia alta en las enfermedades hepáticas, teniendo en cuenta que la biosíntesis de los PUFAs de cadena larga tiene lugar principalmente en el hígado (Cabré *et al.*, 1999).

Por su parte, el segundo artículo (González-Pérez *et al.*, 2009) demuestra que un mayor consumo de ácidos grasos omega-3 atenúa la resistencia a la insulina y la esteatosis hepática avanzada asociadas a la obesidad en ratones obesos de la cepa *ob/ob*. Estos efectos beneficiosos están asociados con el incremento de la expresión de genes implicados en la sensibilidad a la insulina, como el receptor nuclear PPAR γ , los transportadores de glucosa, GLUT-2 y GLUT-4, y las proteínas de señalización del receptor de la insulina, IRS-1 e IRS-2, en el tejido adiposo y en el hígado. Además, los ácidos grasos omega-3 inducen la expresión y producción de adiponectina en tejido adiposo y la fosforilación de AMPK en tejido adiposo y músculo. Tal y como se explica en el *apartado VI.4.1* de la Introducción, la adiponectina es una adipoquina con potentes efectos antiinflamatorios, antiesteatóticos y sensibilizadores a la insulina. Además, en el tejido adiposo de los ratones *ob/ob* tratados con ácidos grasos omega-3 se produce una menor formación de eicosanoides derivados de AA y un aumento concomitante en la generación de protectinas y resolvinas. Este también es el primer trabajo que demuestra la formación de resolvinas y protectinas en el tejido adiposo, además de sus importantes efectos sobre la función de este tejido y las complicaciones de la obesidad, principalmente la resistencia a la insulina y la esteatosis hepática.

La etiología de la EHNA, íntimamente relacionada con la obesidad y la resistencia a la insulina, diferencia a esta enfermedad del resto de patologías hepáticas. De hecho, incluso en ausencia de obesidad, la resistencia a la insulina es capaz de inducir el desarrollo de esteatosis hepática (Angulo, 2002; Ginsberg, 2006). Aunque todavía no están completamente claros los mecanismos que relacionan la resistencia a la insulina y la esteatosis hepática, se ha

demostrado que una sensibilidad alterada a la insulina incrementa la lipogénesis *de novo* hepática e induce la lipólisis de los TG almacenados en los adipocitos, incrementando el flujo de ácidos grasos libres hacia el hígado (Guilherme *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2005). Los resultados de este trabajo demuestran que la administración de DHA mejora de forma notable la tolerancia a la insulina en ratones obesos. La inducción de la expresión de factores de la vía de señalización de la insulina y la captación de glucosa, explica los efectos antiesteatóticos de los ácidos grasos omega-3. Es importante remarcar que estas acciones sensibilizadoras a la insulina se dan de manera muy parecida en el hígado y en el tejido adiposo, ya que los ácidos grasos omega-3 aumentan la expresión de los genes de IRS-1 y GLUT-4, en el tejido adiposo, y de IRS-2 y GLUT-2, en el hígado, a niveles similares. Además de mejorar la sensibilidad a la insulina, los ácidos grasos omega-3 reducen la expresión hepática del gen FASN, una enzima clave en la lipogénesis y aumentan la expresión de PPAR α , que controla la β -oxidación de los ácidos grasos.

Se sabe que la activación de PPAR γ tiene un efecto sensibilizador a la insulina, de hecho, este receptor nuclear es la diana terapéutica de la familia de fármacos antidiabéticos denominados glitazonas, como la rosiglitazona. Además, se ha observado que la expresión de PPAR γ suele estar alterada en la resistencia a la insulina (Semple *et al.*, 2006). En este trabajo demostramos que el 17-HDHA es un potente agonista que PPAR γ y que sus niveles están aumentados en el tejido adiposo de los ratones que reciben una dieta enriquecida con ácidos grasos omega-3.

Por tanto, el principal mecanismo de los efectos sensibilizadores a la insulina de los ácidos grasos omega-3 parece ser la inducción de la expresión y la activación de PPAR γ por los mediadores lipídicos bioactivos derivados de los ácidos grasos omega-3. Tanto es así, que el uso de los derivados del DHA como agonistas de PPAR γ ha despertado mucho interés en el desarrollo de agentes antidiabéticos (Yamamoto *et al.*, 2005).

Otro efecto importante de los ácidos grasos omega-3 sobre el tejido adiposo es la modificación del perfil de adipoquinas secretadas por este tejido. En especial, observamos la inducción de la expresión y el aumento del marcaje inmunofluorescente de adiponectina en el tejido adiposo de los ratones alimentados con ácidos grasos omega-3, que contribuye a explicar los efectos sensibilizadores a la insulina y antiesteatóticos de estos compuestos. También observamos la inducción de la fosforilación de AMPK en el tejido adiposo y el músculo de ratones obesos tratados con ácidos grasos omega-3. Estos resultados están también relacionados con el potente efecto de los ácidos grasos omega-3 y sus derivados sobre PPAR γ , puesto que otros trabajos (Nawrocki *et al.*, 2006) han demostrado que, tras la activación de PPAR γ , para que tengan lugar los efectos sensibilizadores a la insulina, es necesaria la participación de la adiponectina junto a un importante aumento de la actividad de AMPK.

Como se ha apuntado anteriormente, igual que sucede en el hígado de los ratones tratados con CCl₄, el aumento de la ingesta de ácidos grasos omega-3 incrementa la formación de mediadores lipídicos bioactivos derivados de estos ácidos grasos omega-3, como 17-HDHA, RvD1 y PD1 en el tejido adiposo de los ratones tratados con ácidos grasos omega-3. Teniendo en cuenta la mayor formación de estos compuestos y dado que RvE1 es el candidato farmacológico con un mayor potencial dentro de la familia de las resolvinas (Campbell *et al.*, 2007; Connor *et al.*, 2007; Haworth *et al.*, 2008; Schwab *et al.*, 2007; Serhan, 2007; Serhan *et al.*, 2004) elegimos este compuesto y PD1, el miembro más representativo de las protectinas, para realizar una serie de experimentos. Observamos que estas moléculas reproducen los efectos sensibilizadores a la insulina y antiesteatóticos de los ácidos grasos omega-3.

Las acciones protectoras desempeñadas por resolvinas y protectinas están relacionadas con la resolución de la inflamación y son muy potentes, ya que son demostrables a concentraciones nano- e incluso picomolares (Hong *et al.*, 2003; Arita *et al.*, 2005a; Arita *et al.*, 2005b; Marcheselli *et al.*, 2003; Gronert *et al.*, 2005; Campbell *et al.*, 2007; Connor *et al.*, 2007;

Haworth *et al.* 2008; Schwab *et al.*, 2007). La obesidad se define como un estado de inflamación crónica de baja intensidad (Trayhurn, 2005; Tilg *et al.*, 2006) por lo que es muy probable que los efectos antiinflamatorios de los ácidos grasos omega-3 y sus derivados resolvinas y protectinas contribuyan a los efectos beneficiosos que ejercen estos compuestos sobre la resistencia a la insulina y la esteatosis hepática en ratones obesos. Estos resultados coinciden con investigaciones previas que han demostrado que la deficiencia en ácidos grasos omega-3 altera la secreción de VLDL en los hepatocitos (Werner *et al.*, 2005), que el aceite de pescado administrado a través de la dieta disminuye la acumulación de TG en el hígado (Levy *et al.*, 2004), que los PUFAs mejoran la inflamación del tejido adiposo en ratones diabéticos (Todoric *et al.*, 2006) y también que previenen la esteatosis hepática y la disfunción mitocondrial en ratas tratadas con alcohol (Song *et al.*, 2008).

Además, de incrementar la formación de 17-HDHA, RvD1 y PD1, los ácidos grasos omega-3 inhiben la formación de eicosanoides derivados del AA en el tejido adiposo. Es importante destacar que los ácidos grasos omega-3 reducen la formación de eicosanoides derivados de la vía de la 5-LO, establecida recientemente como un importante factor esteatogénico en ratones *ob/ob* (López-Parra *et al.*, 2008).

A parte de unirse y activar PPAR γ , los mediadores lipídicos bioactivos derivados de los ácidos grasos omega-3 también se unen a receptores de membrana acoplados a proteína G. Concretamente, se ha identificado un receptor específico para RvE1, denominado ChemR23 que se expresa en tejidos de humano y ratón, muy abundante en los adipocitos (Arita *et al.*, 2005a; Campbell *et al.*, 2007; Arita *et al.*, 2007). También se ha observado que la chemerina, un ligando peptídico para este receptor, es una adipoquina potente que se asocia con la obesidad (Goralski *et al.*, 2007; Roh *et al.*, 2007; Bozaoglu *et al.*, 2007).

En conjunto, los resultados de este trabajo de tesis doctoral indican que el aumento del consumo de ácidos grasos omega-3 parece ser una buena herramienta para la prevención de

patologías hepáticas y del tejido adiposo con un componente inflamatorio, como la necroinflamación, la esteatosis hepática, la resistencia a la insulina y la obesidad, de manera similar a lo que sucede en la artritis reumatoide, la fibrosis quística, la colitis ulcerosa, la enfermedad de Crohn, el asma y la sepsis (Calder, 2006).

Conclusiones

Los resultados presentados en esta tesis doctoral indican que:

1.- Los ácidos grasos omega-3 protegen a los hepatocitos del daño genotóxico y del estrés oxidativo.

2.- Los ácidos grasos omega-3 disminuyen la necroinflamación hepática y la degeneración hidrópica de los hepatocitos inducidas por CCl₄ en ratones.

3.- Los ácidos grasos omega-3 inhiben la expresión de COX-2 y la producción de PGE₂ a nivel hepático en ratones tratados con CCl₄.

4.- Los ácidos grasos omega-3 también inhiben la expresión de 5-LO en macrófagos y la producción de LTB₄ a nivel hepático en ratones tratados con CCl₄.

5.- Los ácidos grasos omega-3 atenúan la esteatosis hepática en ratones obesos, inhibiendo la expresión de genes lipogénicos (FASN) y activando la de genes de β-oxidación de los ácidos grasos (PPARα) en el hígado.

6.- Los ácidos grasos omega-3 inducen la expresión génica y proteica de la adipocina antiinflamatoria y antiesteatótica adiponectina, sin modular la expresión de otras adipocinas proinflamatorias, como resistina, MCP-1, TNF-α o IL-6.

7.- Los ácidos grasos omega-3 inducen la expresión de genes sensibilizadores a la insulina en el tejido adiposo (PPARγ, IRS-1 y GLUT-4) y en el hígado (PPARγ, IRS-2, GLUT-2) de ratones obesos.

8.- Los ácidos grasos omega-3 mejoran la tolerancia a la insulina y activan la proteína AMPK en el tejido adiposo y el músculo en ratones obesos.

9.- Los ácidos grasos omega-3 inhiben la formación de eicosanoides proinflamatorios en el tejido adiposo de ratones obesos.

10.- Los ácidos grasos omega-3 son transformados a mediadores lipídicos bioactivos, 17-HDHA y PD1 en el hígado; y 17-HDHA, RvD1 y PD1 en el tejido adiposo de ratón.

11.- Igual que su precursor DHA, el 17-HDHA también protege a los hepatocitos del daño genotóxico y del estrés oxidativo. Además, este compuesto reduce la liberación de TNF- α en macrófagos.

12.- 17-HDHA es un potente agonista de PPAR γ , un factor con importantes acciones sensibilizadoras a la insulina y antiinflamatorias.

13.- RvE1 reduce la esteatosis hepática y la presencia de macrófagos en el hígado de ratones obesos. Además, igual que sus precursores omega-3, RvE1 aumenta la expresión génica de adiponectina y otros factores sensibilizadores a la insulina (PPAR γ , IRS-1 y GLUT-4) en el tejido adiposo de ratones obesos.

14.- PD1 induce la expresión de adiponectina en explantes de tejido adiposo de ratón obeso a niveles similares a rosiglitazona, un fármaco antiadiabético de la familia de las glitazonas, cuya diana farmacológica principal es la activación de PPAR γ .

En conjunto, estos resultados indican que los ácidos grasos omega-3 ejercen efectos protectores en la inflamación hepática y las complicaciones asociadas a la obesidad, como la resistencia a la insulina y la esteatosis hepática. Estos efectos beneficiosos de los ácidos grasos omega-3 están mediados, en parte, por la síntesis de resolvinas y protectinas, unos mediadores lipídicos bioactivos derivados de los ácidos grasos omega-3 de reciente caracterización.

Bibliografía

1. Angulo P. N. Nonalcoholic fatty liver disease. *Engl. J. Med.* 2002;346:1221-1231.
2. Ariel A., Li P-L., Wang W., Tang W-X., Fredman G., Hong S., Gotlinger K.H., Serhan C.N. The docosatriene protectin D1 is produced by TH2 skewing and promotes human T cell apoptosis via lipid raft clustering. *J. Biol. Chem.* 2005;280:43079-43086.
3. Arita M., Ohira T., Sun Y.P., Elangovan S., Chiang N., Serhan C.N. Resolvin E1 selectively interacts with leukotriene B4 receptor BLT1 and ChemR23 to regulate inflammation. *J. Immunol.* 2007;178:3912-3917.
4. Arita M., Bianchini F., Aliberti J., Sher A., Chiang N., Hong S., Yang R., Petasis N.A., Serhan C.N. Stereochemical assignment, antiinflammatory properties, and receptor for the omega-3 lipid mediator resolvin E1. *J. Exp. Med.* 2005a;201:713-722.
5. Arita M., Yoshida M., Hong S., Tjonahen E., Glickman J., Petasis N.A., Blumberg R.S., Serhan C.N. Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from omega-3 eicosapentaenoic acid, protects against 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2005b;102:7671-7676.
6. Arita M., Clish C.B., Serhan C.N. The contributions of aspirin and microbial oxygenase in the biosynthesis of anti-inflammatory resolvins: novel oxygenase products from omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005c;338:149-157.
7. Aronson W.J., Glaspy A., Reddy S.T., Reese D., Herber D., Bagga D. Modulation of omega-3/omega-6 polyunsaturated ratios with dietary fish oils in men with prostate cancer. *Urology.* 2001;58:283-288.
8. Bagga D., Wang L., Farias-Eisner R., Glaspy J.A., Reddy S.T. Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2003;100:1751-1756.

9. Baldie G., Kaimakamis D., Rotondo D. Fatty acid modulation of cytokine release from human monocytic cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1993;1179:125-133.
10. Bertolani C., Marra F. The role of adipokines in liver fibrosis. *Pathophysiology.* 2008;15:91-101.
11. Billiar T.R., Bankey P.E., Svingen B.A., Curran R.D., West M.A., Holman R.T., Simmons R.L., Cerra F.B. Fatty acid intake and Kupffer cell function: fish oil alters eicosanoid and monokine production to endotoxin stimulation. *Surgery.* 1988;104:343-349.
12. Bozaoglu K., Bolton K., McMillan J., Zimmet P., Jowett J., Collier G., Walder K., Segal D. Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome. *Endocrinology.* 2007;148:4687-4694.
13. Browning J.D., Horton J.D. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J. Clin. Invest.* 2004;114:147-152.
14. Cabré E., Gassull M.A. Feeding long-chain PUFA to advanced cirrhotics: is it worthwhile? *Nutrition.* 1999;15:322-324.
15. Cabré E., Gassull M.A. Polyunsaturated fatty acid deficiency in liver diseases: pathophysiological and clinical significance. *Nutrition.* 1996;12:542-548.
16. Calder P.C. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006;83:1505S-1519S.
17. Calder P.C. Dietary modification of inflammation with lipids. *Proc. Nutr. Soc.* 2002;61:345-358.
18. Campbell E.L., Louis N.A., Tomassetti S.E., Canny G.O., Arita M., Serhan C.N., Colgan S.P. Resolvin E1 promotes mucosal surface clearance of neutrophils: a new paradigm for inflammatory resolution. *FASEB J.* 2007;21:3162-3170.

19. Caughey G.E., Mantzioris E., Gibson R.A., Clealand L.G., James M.J. The effect on human tumor necrosis factor α and interleukin 1 β production of diets enriched in n-3 fatty acids from vegetable oil or fish oil. *Am. J. Clin. Nutr.* 1996;63:116-122.
20. Clària J., Titos E. Kupffer cell. *Gastroenterol. Hepatol.* 2004;27:264-273.
21. Clària J., Jiménez W. Renal dysfunction and ascites in carbon tetrachloride-induced cirrhosis in rats. In: Arroyo V., Ginès P., Rodés J. And Schrier R.W., eds. *Ascites and renal dysfunction in liver disease. Pathogenesis, diagnosis and treatment.* Malden, MA, USA: Blackwell Science Inc, 1999. Chapter 22, 379-396.
22. Clària J., Jiménez W., Ros J., Asbert M., Castro A., Arroyo V., Rivera F., Rodés J. Pathogenesis of arterial-hypotension in cirrhotic rats with ascites – role of endogenous nitric-oxide. *Hepatology.* 1992;15:343-349.
23. Clark J.M., Brancati F.L., Diehl, A.M. Nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002;122:1649-1657.
24. Connor K.M., SanGiovanni J.P., Lofqvist C., Aderman C.M., Chen J., Higuchi A., Hong S., Pravda E.A., Majchrzak S., Carper D., Hellstrom A., Kang J.X., Chew E.Y., Salem N. Jr., Serhan C.N., Smith L.E. Increased dietary intake of omega-3-polyunsaturated fatty acids reduces pathological retinal angiogenesis. *Nat. Med.* 2007;13:868-873.
25. Culp B.R., Titus B.G., Lands W.E. Inhibition of prostaglandin biosynthesis by eicosapentaenoic acid. *Prostaglandins Med.* 1979;3:269-278.
26. Curtis C.L., Hughes C.E., Flannery C.R., Little C.B., Harwood J.L., Caterson B. n-3 fatty acids specifically modulate catabolic factors involved in articular cartilage degradation. *J. Biol. Chem.* 2000;275:721-724.
27. Das U.N. Essential fatty acids- A review. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2006;7:467-482.
28. Day C.P. Non-alcoholic fatty liver disease: current concepts and management strategies. *Clin Med.* 2006a;6:19-25.

29. Day C.P. From fat to inflammation. *Gastroenterology* 2006b;130:207-210.
30. Day C.P., James O.F. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*. 1998;114:842-845.
31. Decker K. Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur. J. Biochem.* 1990;192:245-261.
32. Diehl A.M. Cytokine regulation of liver injury and repair. *Immunol. Rev.* 2000;174:160-171.
33. Dienstag J.L., Goldin R.D., Healthcote E.J., Hann H.W., Woessner M., Stephenson S.L., Gardner S., Gray D.F., Schiff E.R. Histological outcome during long-term lamivudine therapy. *Gastroenterology*. 2003;124:105-117.
34. Duchatelle V., Marcellin P., Giostra E., Bregeaud L., Pouteau M., Boyer N., Auperin A., Guerret S., Erlinger S., Henin D., Degott C. Changes in liver fibrosis at the end of alpha interferon therapy and 6 to 18 months later in patients with chronic hepatitis C: quantitative assessment by a morphometric method. *J. Hepatol.* 1998;29:20-28.
35. Duffield J.S., Hong S., Vaidya V.S., Lu Y., Fredman G., Serhan C.N., Bonventre J.V. Resolvin D series and protectin D1 mitigate acute kidney injury. *J. Immunol.* 2006;177:5902-5911.
36. Endres S., Ghorbani R., Kelley V.E., Georgilis K., Lonnemann G., van der Meer J.W., Cannon J.G., Rogers T.S., Klempner M.S., Weber P.C., Schaeffer E.J., Wolf S.M., Dinarello C.A. The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. *N. Engl. J. Med.* 1989;320:265-271.
37. Friedman S.L. *Alcohol Health & Research World.* 1997;21:310-316.

38. Frühbeck G. Adipose tissue in obesity and metabolic disorders. Adipose tissue protocols. Second Edition. Methods in molecular biology. Humana Press. 2008. Vol. 456.
39. Gibney M.J., Hunter B. The effects of short- and long-term supplementation with fish oil on the incorporation of n-3 polyunsaturated fatty acids into cells of the immune system in healthy volunteers. *Eur. J. Clin. Nutr.* 1993;47:255-259.
40. Ginsberg H.N. Is the slippery slope from steatosis to steatohepatitis paved with triglyceride or cholesterol? *Cell Metab.* 2006;4:179-181.
41. Glass C.K. Going nuclear in metabolic and cardiovascular disease. *J. Clin. Invest.* 2006;116:556-560.
42. Goldman D.W., Pickett W.C., Goetzl E.J. Neutrophil chemotactic and degranulating activities of leukotriene B₅ (LTB₅) derived from eicosapentaenoic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1983;117:282-288.
43. González-Pérez A., Horrillo R., Ferré N., Gronert K., Dong B., Morán-Salvador E., Títos E., Martínez-Clemente M., López-Parra M., Arroyo V., Clària J. Obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis are alleviated by ω -3 fatty acids: a role for resolvins and protectins. *FASEB J.* 2009;DOI:10.1096/fj.08-125674.
44. González-Pérez A., Planagumà A., Gronert K., Miquel R., López-Parra M., Títos E., Horrillo R., Ferré N., Deulofeu R., Arroyo V., Rodés J., Clària J. Docosahexaenoic acid (DHA) blunts liver injury by conversión to protective lipid mediators: protectin D1 and 17S-hydroxy-DHA. *FASEB J.* 2006;20:E1844-E1855.
45. Goralski K.B., McCarthy T.C., Hanniman E.A., Zabel B.A., Butcher E.C., Parlee S.D., Muruganandan S., Sinal C.J. Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism. *J. Biol. Chem.* 2007;282:28175-28188.

46. Gronert K., Maheshwari N., Khan N., Hassan I.R., Dunn M., Laniado Schwartzman M. A role for the mouse 12/15-lipoxygenase pathway in promoting epithelial wound healing and host defense. *J. Biol. Chem.* 2005;280:15267–15278.
47. Guilherme A., Virbasius J.V., Puri V., Czech M.P. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2008;9:367-377.
48. Halliwell B., Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* 1993;57:715S-724S.
49. Hammel P., Couvelard A., O'Toole D., Ratouis A., Sauvanet A., Fléjou J.F., Degott C., Belghiti J., Bernades P., Valla D., Ruzsiewicz P., Lévy P. Regression of liver fibrosis after biliary drainage in patients with chronic pancreatitis and stenosis of the common bile duct. *New Engl. J. Med.* 2001;344:418-423.
50. Haworth O., Cernadas M., Yang R., Serhan C.N., Levy, B.D. Resolvin E1 regulates interleukin 23, interferon-gamma and lipoxin A4 to promote the resolution of allergic airway inflammation. *Nat. Immunol.* 2008;9:873-879.
51. Healy D.A., Wallace F.A., Miles E.A., Calder P.C., Newsholme P. The effect of low to moderate amounts of dietary fish oil on neutrophil lipid composition and function. *Lipids.* 2000;35:763-768.
52. Holcomb I.N., Kabakoff R.C., Chan B., Baker T.W., Gurney A., Henzel W., Nelson C., Lowman H.B., Wright B.D., Skelton N.J., Frantz G.D., Tumas D.B., Peale F.V.Jr., Shelton D.L., Hébert C.C. FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family. *EMBO J.* 2000;19:4046-4055.
53. Hong S., Gronert K., Devchand P.R., Moussignac R.L., Serhan C.N. Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells. Autacoids in anti-inflammation. *J. Biol. Chem.* 2003;278:14677-14687.

54. Iredale J., Beyon R., Pickering J., McCullen M., Northrop M., Pawley S., Hovell C., Arthur M.J. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J. Clin. Invest.* 1998;102:538-549.
55. Jiménez W., Clària J., Arroyo V., Rodés J. Carbon-tetrachloride induced cirrhosis in rats – a useful tool for investigating the pathogenesis of ascites in chronic liver-disease. *J. Gastroenrol. Hepatol.* 1992;7:90-97.
56. Kamada Y., Tamura S., Kiso S., Matsumoto H., Saji Y., Yoshida Y., Fukui K., Maeda N., Nishizawa H., Nagaretani H., Okamoto Y., Kihara S., Miyagawa J., Shinomura Y., Funahashi T., Matsuzawa Y. Enhanced carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice lacking adiponectin. *Gastroenterology.* 2003;125:1796-1807.
57. Kielar M.L., Jeyarajah D.R., Zhou X.J., Lu C.Y. Docosahexaenoic acid ameliorates murine ischemic acute renal failure and prevents increases in mRNA abundance for both TNF-alpha and inducible nitric oxide synthase. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2003;14:389-396.
58. Kim K.H., Lee K., Moon Y.S., Sul H.S. A cysteine rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocytes differentiation. *J. Biol. Chem.* 2001;276:11252-11256.
59. Klaude M., Eriksson S., Nygren J., Ahnström G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat. Res.* 1996;363:89-96.
60. Koerner A., Kratzsch J., Kiess W. Adipocytokines: leptin - the classical, resistin - the controversial, adiponectin - the promising, and more to come. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005;19:525-546.
61. Lee T.H., Hoover R.L., Williams J.D., Sperling R.I., Ravalese J., Spur B.W., Robinson D.R., Corey E.J., Lewis R.A., Austen K.F. Effects of dietary enrichment with eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on in vitro neutrophil and monocyte

- leukotriene generation and neutrophil function. *N. Engl. J. Med.* 1985;312;12:1217-1224.
62. Lee T.H., Mencia-Huerta J.M., Shih C., Corey E.J., Lewis R.A., Austen K.F. Characterization and biologic properties of 5,12-dihydroxy derivatives of eicosapentaenoic acid, including leukotriene-B₅ and the double lipoxygenase product. *J. Biol. Chem.* 1984;259:2383-2389.
 63. Levy B.D., Kohli P., Gotlinger K., Haworth O., Hong S., Kazani S., Israel E., Haley K.J., Serhan C.N. Protectin D1 is generated in asthma and dampens airway inflammation and hyper-responsiveness. *J. Immunol.* 2007;178:496:502.
 64. Levy J.R., Clore J.N., Stevens, W. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids decrease hepatic triglycerides in Fischer 344 rats. *Hepatology.* 2004;39:608-616.
 65. Llor X., Pons E., Roca A., Àlvarez M., Mañé J., Fernández-Bañares F., Gassull M.A. The effects of fish oil, olive oil, oleic acid and linoleic acid on colorectal neoplastic processes. *Clin. Nutr.* 2003;22:71-79.
 66. Long Y.C., Zierath J.R. AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J. Clin. Invest.* 2006;116:1776-1783.
 67. López-Parra M., Titos E., Horrillo R., Ferré N., González-Pérez A., Martínez-Clemente M., Planagumà A., Masferrer J.L., Arroyo V., Clària J. Regulatory effects of Arachidonate 5-lipoxygenase on hepatic MTP activity and VLDL-TG and ApoB secretion in obese mice. *J. Lipid Res.* 2008;49:2513-2523.
 68. López-Parra M., Telleria N., Titos E., Planagumà A., González-Pérez A., Arroyo V., Rodés J., Clària J. Gene expression profiling of renal dysfunction in rats with experimental cirrosis. *J. Hepatol.* 2006;45:221-229.
 69. López-Parra M., Clària J., Titos E., Planagumà A., Párrizas M., Masferrer J.L., Jiménez W., Arroyo V., Rivera F., Rodés J. The selective cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib

- modulates the formation of vasoconstrictor eicosanoids and activates PPARgamma. Influence of albumin. *J. Hepatol.* 2005;42:75-81.
70. López-Parra M., Clària J., Planagumà A., Titos E., Masferrer J.L., Woerner B.M., Koki A.T., Jiménez W., Arroyo V., Rivera F., Rodés J. Renal effects of selective cyclooxygenase inhibition in experimental liver disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2003;525:133-136.
71. López-Parra M., Clària J., Planagumà A., Titos E., Masferrer J.L., Woerner B.M., Koki A.T., Jiménez W., Altuna R., Arroyo V., Rivera F., Rodés J. Cyclooxygenase-1 derived prostaglandins are involved in the maintenance of renal function in rats with cirrhosis and ascites. *Br. J. Pharmacol.* 2002;135:891-900.
72. Lotersztajn S., Julien B., Teixeira-Clerc F., Grenard P., Mallat A. Hepatic fibrosis: molecular mechanisms and drug targets. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2005;45:605-628.
73. Marcheselli V.L., Hong S., Lukiw W.J., Tian X.H., Gronert K., Musto A., Hardy M., Gimenez J.M., Chiang N., Serhan C.N., Bazan N.G. Novel docosanoids inhibit brain ischemia-reperfusion-mediated leukocyte infiltration and proinflammatory gene expression. *J. Biol. Chem.* 2003 ;278:43807–43817.
74. Masaki T., Chiba S., Tatsukawa H., Yasuda T., Noguchi H., Seike M., Yoshimatsu H. Adiponectin protects LPS-induced liver injury through modulation of TNF-alpha in KK-Ay obese mice. *Hepatology.* 2004;40:177-184.
75. Miyamoto A., Wakabayashi H., Watanabe A. Abnormality in fatty acid composition of gastric mucosal phospholipids in patients with liver cirrhosis and its correction with a polyunsaturated fatty acid-enriched soft oil capsule. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 1997;12:644-652.

76. Mukherjee P.K., Marcheselli V.L., Serhan C.N., Bazan N.G. Neuroprotectin D1: a docosahexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2004;101:8491-8496.
77. Narayanan B.A., Narayanan N.K., Simi B., Reddy B.S. Modulation of inducible nitric oxide synthase and related proinflammatory genes by the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid in human colon cancer cells. *Cancer Res.* 2003;63:972-979.
78. Nawrocki A.R., Rajala M.W., Tomas E., Pajvani U.B., Saha A.K., Trumbauer M.E., Pang Z., Chen A.S., Ruderman N.B., Chen H., Rossetti L., Scherer P.E. Mice lacking adiponectin show decreased hepatic insulin sensitivity and reduced responsiveness to peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J. Biol. Chem.* 2006;281:2654-2660.
79. Owen J.S., Bruckdorfer K.R., Day R.C., McIntyre N. Decreased erythrocyte membrane fluidity and altered lipid composition in human liver disease. *J. Lipid. Res.* 1982;23:124-132.
80. Owen J.S., Hutton R.A., Day R.C., Bruckdorfer K.R., McIntyre N. Platelet lipid composition and platelet aggregation in human liver disease. *J. Lipid. Res.* 1981;22:423-430.
81. Planagumà A., Clària J., Miquel R., López-Parra M., Titos E., Masferrer J.L., Arroyo V., Rodés J. The selective cyclooxygenase-2 inhibitor SC-236 reduces liver fibrosis by mechanisms involving non-parenchymal cell apoptosis and PPARgamma activation. *FASEB J.* 2005;19:1120-1122.
82. Planagumà A., Titos E., López-Parra M., Gaya J., Pueyo G., Arroyo V., Clària J. Aspirin (ASA) regulates 5-lipoxygenase activity and peroxisome proliferator-activated receptor alpha-mediated CINC-1 release in rat liver cells: novel actions of lipoxin A4 (LXA4) and ASA-triggered 15-epi-LXA4. *FASEB J.* 2002;16:1937-1939.

83. Qureshi K., Abrams G.A. Metabolic liver disease of obesity and role of adipose tissue in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* 2007;13:3540-3553.
84. Roh S.G., Song S.H., Choi K.C., Kato K., Wittamer V., Parmentier M., Sasaki S. Chemerin - a new adipokine that modulates adipogenesis via its own receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007;362:1013-1018.
85. Rousseau D., Hélias-Toussaint C., Moreau D., Raederstorff D., Grynberg A. Dietary n-3 PUFAs affect the blood pressure rise and cardiac impairments in a hyperinsulinemia rat model in vivo. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2003;285:H1294-1302.
86. Rousseau D., Hélias-Toussaint C., Raederstorff D., Moreau D., Grynberg A. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids affect the development of renovascular hypertension in rats. *Mol. Cell. Biochem.* 2001;225:109-119.
87. Schäffler A., Schölmerich J., Büchler C. Mechanisms of disease : adipocytokines and visceral adipose tissue – emerging role in nonalcoholic fatty liver disease. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* 2005;6:273-280.
88. Scherer P.E., Williams S., Fogliano M., Baldini G., Lodish H.F. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 1995;270:26746-26749.
89. Schwab J.M., Chiang N., Arita M., Serhan C.N. Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature* 2007;447:869-874.
90. Semple R.K., Chatterjee V.K., O'Rahilly S. PPAR gamma and human metabolic disease. *J. Clin. Invest.* 2006;116:581-589.
91. Serhan C.N., Chiang N., Van Dyke T.E. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat. Rev. Immunol.* 2008;8:349-361.

92. Serhan C.N. Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annu. Rev. Immunol.* 2007;25:101-137.
93. Serhan C.N., Gotlinger K., Hong S., Lu Y., Siegelman J., Baer T., Yang R., Colgan S.P., Petasis N.A. Anti-inflammatory actions of neuroprotectin D1/protectin D1 and its natural stereoisomers: assignments of dihydroxy-containing docosatrienes. *J. Immunol.* 2006;176:1848-1859.
94. Serhan C.N., Gotlinger K., Hong S., Arita M. Resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins, novel omega-3-derived mediators, and their aspirin-triggered endogenous epimers: an overview of their protective roles in catabasis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2004;73:155-172.
95. Serhan C.N., Hong S., Gronert K., Colgan S.P., Devchand P.R., Mirick G., Moussignac R.L. Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. *J. Exp. Med.* 2002;196:1025-1037.
96. Serhan C.N., Clish C.B., Brannon J., Colgan S.P., Chiang N., Gronert K. Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. *J. Exp. Med.* 2000;192:1197-1204.
97. Shoelson S.E., Herrero L., Naaz A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology.* 2007;132:2169-2180.
98. Singh N.P., McCoy M.T., Tice R., Schneider E. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.* 1988;175:184-191.

99. Song B.J., Moon K.H., Olsson N.U., Salem N. Jr. Prevention of alcoholic fatty liver and mitochondrial dysfunction in the rat by long-chain polyunsaturated fatty acids. *J. Hepatol.* 2008;49:262-273.
100. Sperling R.I., Benincaso A.I., Knoell C.T., Larkin J.K., Austen K.F., Robinson D.R. Dietary ω -3 polyunsaturated fatty acids inhibit phosphoinositide formation and chemotaxis in neutrophils. *J. Clin. Invest.* 1993;91:651-660.
101. Stepan C.M., Bailey S.T., Bhat S., Brown E.J., Banerjee R.R., Wright C.M., Patel H.R., Ahima R.S., Lazar M.A. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature.* 2001;409:307-312.
102. Thomas E.L., Taylor-Robinson S.D., Barnard M.L., Frost G., Sargentoni J., Davidson B.R., Cunnane S.C., Bell J.D. Changes in adipose tissue composition in malnourished patients before and after liver transplantation: a carbon-13 magnetic resonance spectroscopy and gas-liquid chromatography study. *Hepatology.* 1997;25:178-183.
103. Thompson K., Maltby J., Fallowfield J., McAulay M., Millward-Sadler H., Sheron N. Interleukin-10 expression and function in experimental murine liver inflammation and fibrosis. *Hepatology.* 1998;28:1597-1606.
104. Tilg, H., Moschen A.R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2006;6:772-783.
105. Titos E., Clària J., Planagumà A., López-Parra M., González-Pérez A., Gaya J., Miquel R., Arroyo V., Rodés J. Inhibition of 5-lipoxygenase-activating protein abrogates experimental liver injury: role of Kupffer cells. *J. Leukoc. Biol.* 2005;78:871-878.
106. Titos E., Planagumà A., López-Parra M., Villamor N., Miquel R., Jiménez W., Arroyo V., Rivera F., Rodés J., Clària J. 5-Lipoxygenase (5-LO) is Involved in Kupffer Cell Survival. Possible Role of 5-LO Products in the Pathogenesis of Liver Fibrosis. *Comp. Hepatol.* 2004;3:S19.

107. Titos E., Clària J., Planagumà A., López-Parra M., Villamor N., Párrizas M., Carrió A., Miquel R., Jiménez W., Arroyo V., Rivera F., Rodés J. Inhibition of 5-lipoxygenase induces cell growth arrest and apoptosis in rat Kupffer cells: implications for liver fibrosis. *FASEB J.* 2003;17:1745-1747.
108. Titos E., Chiang N., Serhan C.N., Romano M., Gaya J., Pueyo G., Clària J. Aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 biosynthesis in rat liver cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2002;507:199-209.
109. Titos E., Clària J., Bataller R., Bosch-Marcé M., Ginès P., Jiménez W., Arroyo V., Rivera F., Rodés J. Hepatocyte-derived cysteinyl leukotrienes modulate vascular tone in experimental cirrhosis. *Gastroenterology.* 2000;119:794-805.
110. Tjonahen E., Oh S.F., Siegelman J., Elangovan S., Percarpio K.B., Hong S., Arita M., Serhan C.N. Resolvin E2 : identification and anti-inflammatory actions : pivotal role of human 5-lipoxygenase in resolvin E2 series biosynthesis. *Chem. Biol.* 2006;13:1193-1202.
111. Todoric J., Löffler M., Huber J., Bilban M., Reimers M., Kadl A., Zeyda M., Waldhäusl W., Stulnig T.M. Adipose tissue inflammation induced by high-fat diet in obese diabetic mice is prevented by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Diabetologia* 2006;49:2109-2119.
112. Trayhurn P. Endocrine and signalling role of adipose tissue: new perspectives on fat. *Acta Physiol. Scand.* 2005;184:285-293.
113. Tsochatzis E., Papatheodoridis G.V., Archimandritis A.J. The evolving role of leptin and adiponectin in chronic liver diseases. *Am. J. Gastroenterol.* 2006 ;101 :2629-2640.
114. Vecchini A., Ceccarelli V., Susta F., Calgiana P., Orvietani P., Binaglia L., Nocentini G., Riccardi C., Calviello G., Palozza P., Maggiano N., Di Nardo P. Dietary alpha-linolenic

- acid reduces COX-2 expression and induces apoptosis of hepatoma cells. *J. Lipid Res.* 2004;45:308-316.
115. Von Schacky C., Kiefl R., Jendraschak E., Kaminski W.E. N-3 fatty acids and cysteinyl-leukotriene formation in humans in vitro, ex vivo and in vivo. *J. Lab. Clin. Med.* 1993;121:302-309.
116. Wallace F.A., Miles E.A., Calder P.C. Activation state alters the effect of dietary fatty acids on pro-inflammatory mediator production by murine macrophages. *Cytokine.* 2000;12:1374-1379.
117. Watanabe A., Saito S., Tsuchida T., Higuchi K., Okita M. Low plasma levels of docosahexaenoic acid in patients with liver cirrhosis and its correction with a polyunsaturated fatty acid-enriched soft oil capsule. *Nutrition.* 1999;15:284-288.
118. Weisberg S.P., McCann D., Desai M., Rosenbaum M., Leibel R.L., Ferrante A.W. Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 2003;112:1796-1808.
119. Werner A., Havinga R., Bos T., Bloks V.W., Kuipers F., Verkade H.J. Essential fatty acid deficiency in mice is associated with hepatic steatosis and secretion of large VLDL particles. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2005;288:G1150-1158.
120. Xu A., Wang Y., Keshaw H., Xu L.Y., Lam K.S., Cooper G.J. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J. Clin. Invest.* 2003;112:91-100.
121. Yamamoto K., Itoh T., Abe D., Shimizu M., Kanda T., Koyama T., Nishikawa M., Tamai T., Ooizumi H., Yamada S. Identification of putative metabolites of docosahexaenoic acid as potent PPARgamma agonists and antidiabetic agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2005;15:517-522.

122. Yaqoop P., Pala H.S., Cortina-Borja M., Newsholme E.A., Calder P.C. Encapsulated fish oil enriched in α -tocopherol alters plasma phospholipid and mononuclear cell fatty acid compositions but not mononuclear cell functions. *Eur. J. Clin. Invest.* 2000;30:260-274.
123. Yu Y.H., Ginsberg H.N. Adipocyte signaling and lipid homeostasis: sequelae of insulin-resistant adipose tissue. *Circ. Res.* 2005;96:1042-1052.
124. Zhang Y., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopold L., Friedman J.M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994;372:425-432.

Anexo 1: Materiales y métodos

I.- MATERIALES BIOLÓGICOS

1.-Animales

Las cepas de ratones 129S2/SVPasCrl (*129SV*), B6.V-Lep^{ob/J} (*ob/ob*) y C57BL usadas en este trabajo fueron adquiridas a Charles River (Saint Aubin les Elseuf, France) y alojadas en el estabulario de la facultad de Medicina de la Universitat de Barcelona.

2.-Líneas celulares

Las líneas murinas de macrófagos Raw 264.7 y hepatocitos CC-1, así como la línea COS-7 procedentes del riñón del mono verde africano, fueron adquiridas en la *European Collection of Cell Cultures* (ECACC, Salisbury, UK).

3.-Anticuerpos

La siguiente tabla recoge todos anticuerpos primarios usados en este trabajo:

<i>Antígeno</i>	<i>Procedencia</i>	<i>Uso y Dilución</i>	<i>Uso</i>	<i>Huésped</i>
5-LO murina	Dr. Jilly Evans (Merck Research Laboratories, Rahway, NJ, USA).	Western Blot, 1/10 ³	Western Blot	Conejo
AMPK ratón	Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)	Western Blot, 1/10 ³	Western Blot	Conejo
Fosfo-AMPK (Thr172) ratón	Cell Signaling Technology	Western Blot, 1/10 ³	Western Blot	Conejo
F4/80 ratón	Serotec (Oxford, UK)	Inmunohistoquímica, 1/100	Inmunohistoquímica	Rata
Adiponectina ratón	Abcam (Cambridge, UK)	Inmunofluorescencia, 1/500	Inmunofluorescencia	Conejo

4.-Plásmidos

Para los ensayos de transactivación de PPAR γ (ver apartado IV.4 de esta sección) se utilizaron tres plásmidos. Uno de ellos, denominado PPAR γ -GAL4, codificaba una proteína de fusión que contenía el dominio de unión al DNA de GAL4 de levadura unido al dominio de unión de ligando de PPAR γ . El segundo plásmido, denominado MH100-tk-luc, era un reportero que contenía el gen de luciferasa y una secuencia reconocida por GAL4 repetida cuatro veces (UAS $_6$ x4). De este modo, si una de las moléculas añadidas a las células activa PPAR γ , la proteína de fusión PPAR γ -GAL4 se expresará e inducirá a su vez la expresión de la proteína luciferasa del otro plásmido, cuya señal luminiscente se puede medir fácilmente con un luminómetro. El tercer plásmido expresaba la proteína β -galactosidasa y se co-transfectó como control de la eficiencia de transfección para la normalización de los resultados.

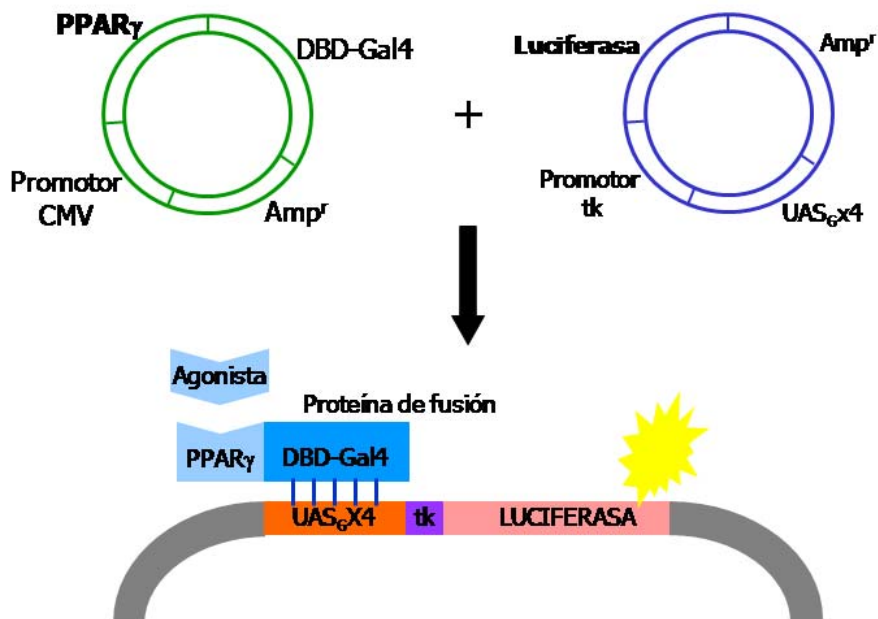


Figura 14. Esquema de los plásmidos utilizados en los ensayos de transactivación de PPAR γ .

II.- TAMPONES Y MEDIOS

1.- Tampones y soluciones

<i>Nombre</i>	<i>Composición</i>	<i>Uso</i>
Tampón de lisis	2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 10% Triton X-100 (añadir justo antes de su uso); pH 10; 4°C protegido de la luz.	Comet Assay
Tampón de electroforesis	300 mM NaOH, 1 mM EDTA; pH 13; 4°C (Soluciones stock: NaOH 10N; EDTA 200 mM; 4°C)	Comet Assay
Tampón de neutralización	400 mM Tris; pH 7,5 ; 4°C	Comet Assay
Tampón de lisis TLB	1 M Tris/HCl pH 7.4, 1% tritón X-100, 10% glicerol, 137 mM NaCl, 0,5 mM EDTA e inhibidores de proteasas	Extracción proteína total Raw 264.7
Tampón de homogeneización	2 mM EGTA, 5 mM EDTA, 40 mM β-glicerol fosfato, 0,5% Igepal, 20 mM MOPS, <i>inhibidores de fosfatasas</i> : 30 mM fluoruro de sodio, 10 mM pirofosfato de sodio decahidratado, 2 mM ortovanadato de sodio, e inhibidores de proteasas; 4°C	Extracción proteína total de hígado y músculo de ratón
Tampón de homogeneización	50 mM HEPES, 20 mM β-glicerol, 2 mM EDTA, 1% Igepal, 10% glicerol, 1 mM MgCl ₂ , 1 mM CaCl ₂ , 150 mM NaCl, <i>inhibidores de fosfatasas</i> : 10 mM fluoruro de sodio, 20 mM pirofosfato de sodio decahidratado, 2 mM ortovanadato de sodio e inhibidores de proteasas, 4°C	Extracción proteína total de tejido adiposo de ratón
<i>Upper buffer</i>	0,5 M Tris, pH 6,8	Western blot
<i>Lower buffer</i>	1,5 M Tris pH 8,8	Western blot
Tampón de electroforesis x10	1,91 M Glicina, 251 mM Tris, 34,67 mM SDS	Western blot
Tampón de carga x6	7 mL <i>Upper buffer</i> , 3,6 mL glycerol, 1 g SDS, 600 μL β-mercaptoEtOH, 4 g azul de bromofenol, -20°C	Western blot
Tampón de transferencia x10	1,91 M Glicina, 251 mM Tris	Western blot
TBS (<i>Tris-buffered saline</i>)	20 mM Tris, 0,5 M NaCl; pH 7,6	Western blot
Tampón de <i>stripping</i>	100 mM β-mercaptoEtOH, 2% SDS, 62,5 mM Tris; pH 6,7	Western blot
Solución de exposición del antígeno	0,05% tripsina, 0,1% CaCl ₂	Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia
Hexano/isopropanol	Mezclar hexano e isopropanol en una proporción 3/2 (vol./vol.); 4°C	Extracción de lípidos totales de tejido
MeOH/H ₂ O _d	Mezclar MeOH y H ₂ O _d en una proporción 65/35 (vol./vol.)	Obtención de extractos lipídicos

2.- Medios de cultivo

<i>Nombre Medio y Línea celular</i>	<i>Composición</i>	<i>Uso</i>
DMEM completo Raw 264.7	DMEM + 2mM L-glutamina + 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomina + 10% FBS	Cultivo
DMEM sin suero Raw 264.7	DMEM + 2mM L-glutamina + 50 U/ml penicilina y 50 µg/ml estreptomina	Incubaciones
EMEM completo CC-1	EMEM + 2mM L-glutamina + 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomina + 20 mM HEPES + 1% NEAA (ámnoácidos no esenciales) + 10% FBS	Cultivo
EMEM sin suero CC-1	EMEM + 2mM L-glutamina + 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomina + 20 mM HEPES + 1% NEAA (ámnoácidos no esenciales)	Incubaciones
DMEM completo COS-7	DMEM + 2mM L-glutamina + 50 U/ml penicilina y 50 µg/ml estreptomina + 10% FBS	Cultivo
DMEM sin suero COS-7	DMEM + 2mM L-glutamina + 50 U/ml penicilina y 50 µg/ml estreptomina	Incubaciones
DPBS ^{-/-} +Pen/Strepto Explantes	DPBS ^{-/-} + 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomina	Aislamiento
DMEM 0,5% BSA Explantes	DMEM + 2mM L-glutamina + 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomina + 0,5% BSA fatty acid free	Incubaciones

3.- TaqMan® Gene Expression Assays

<i>Nombre el gen</i>	<i>ID</i>
COX-2	Mm00478374_m1
Adiponectin	Mm00456425_m1
FASN	Mm00662319_m1
GLUT-2	Mm00446224_m1
GLUT-4	Mm00436615_m1
HSL	Mm00495359_m1
IL-6	Mm00446190_m1
IRS-1	Mm01278327_m1
IRS-2	Mm03038438_m1
MCP-1	Mm00441242_m1
PPAR α	Mm00440939_m1
PPAR γ	Mm00440945_m1
Resistin	Mm00445641_m1
SCD-1	Mm00772290_m1
SREBP-1c	Mm00550338_m1
TNF- α	Mm00443258_m1
β -actin	Mm00607939_s1

III.- ESTUDIOS CON ANIMALES

Todos los estudios con animales se realizaron siguiendo los criterios del Comité de Ética e Investigación del Hospital Clínic y las leyes de la Comunidad Europea vigentes sobre el uso de animales de experimentación.

1.- Ratones 129SV alimentados con ácidos grasos omega-3 y tratados con CCl₄.

Los ratones macho de la cepa 129S2/SvPasCrl se distribuyeron en cajas de plástico con virutas de serrín y se les permitió acceso libre a comida y agua durante la semana del periodo de aclimatación. Transcurrido este tiempo se establecieron tres grupos y a cada uno se le asignó a una dieta control (*grupo control*, n=8), una dieta experimental enriquecida con DHA (*grupo DHA*, n=8) o una dieta experimental enriquecida con DHA y EPA (*grupo DHA+EPA*, n=8). Los ácidos grasos experimentales se incorporaron a una dieta base compuesta de almidón (522.1 g/kg), sacarosa (100 g/kg), celulosa (50 g/kg), caseína (190 g/kg), L-cistina (1.8 g/kg), lípidos (84.1 g/kg), mezcla de sales (40 g/kg, ICN 960401), mezcla de vitaminas (10 g/kg, ICN 960402) y bitartrato de colina (2 g/kg). La parte lipídica (84.1 g/kg) estaba compuesta por 40 g/kg de Manteca de cacao y 44.1 g/kg de aceite de girasol (*grupo Control*) ó 30.4 g/kg aceite de girasol + 13.7 g/kg ácidos grasos omega-3 en forma de DHA purificado al 70% (*grupo DHA*) o una mezcla de DHA y EPA al 80% (*grupo DHA+EPA*). Estas dietas ya se habían usado como fuente de omega-3 en distintos modelos animales de enfermedades (Rousseau *et al.*, 2001; Rousseau *et al.*, 2003). Las dietas se guardaban en alícuotas a -20°C y se administraba dieta fresca a diario para evitar la oxidación de los ácidos grasos. Una semana después de haber empezado a recibir las dietas experimentales, se inició el tratamiento con inyecciones intraperitoneales de CCl₄ (1 mL/kg peso corporal con aceite de oliva como transportador) cada lunes y viernes durante cinco semanas. A lo largo del estudio se controlaron la ingesta y el peso de los animales. Al finalizar los tratamientos los animales fueron

sacrificados usando isofluorano como anestesia. Se extrajo el hígado de cada individuo, y tras lavarlo con DPBS^{-/-}, una parte se fijó en formol al 10% para su posterior tinción y estudio histológico y el resto se troceó en pequeñas porciones que se congelaron en nitrógeno líquido para realizar análisis de expresión génica y medición de eicosanoides y mediadores lipídicos derivados del DHA.

2.- Ratones *ob/ob* alimentados con ácidos grasos omega-3.

Los ratones *ob/ob* macho se alojaron en cajas de plástico con virutas de serrín y con acceso libre a comida y agua durante la semana del periodo de aclimatación. Transcurrido este tiempo, los ratones *ob/ob* se repartieron en dos grupos experimentales que recibieron una dieta control (*grupo* Control, n=8) o una dieta enriquecida con ácidos grasos omega-3 (*grupo* ω -3, n=16) durante cinco semanas. Las dietas ya se habían usado previamente (Rousseau *et al.*, 2001; Rousseau *et al.*, 2003). Igual que con el estudio anterior, las dietas se guardaban en alícuotas a -20°C y diariamente se administraba a los animales dieta fresca para evitar la oxidación de los ácidos grasos. A lo largo del estudio se controlaron la ingesta y el peso de los animales.

2.1.- Grupos adicionales de estudio.

Dos grupos adicionales de ratones *ob/ob* (n=10) y sus respectivos controles (n=10) recibieron inyecciones intraperitoneales de DHA a una dosis de 4 µg/g peso corporal cada 12 horas durante 4 días o bien RvE1 a una dosis de 1,2 ng/g peso corporal cada 24 horas durante 4 días. La solución de DHA administrada a los ratones se preparó según lo indicado (Kielar *et al.*, 2003). El DHA se disolvió en EtOH absoluto a una concentración de 20 mg/mL. Se añadieron 50 µL de esta solución a 1 mL de una solución de BSA 0,1 g/mL libre de ácidos grasos. La mezcla se vorteoó durante 2 min y se incubó a 37°C durante 2 horas. El

resultado fue una solución transparente que se usó en la dilución apropiada para obtener la dosis deseada de DHA.

2.2.- Test de tolerancia a la insulina (ITT)

Los ratones *ob/ob* tratados con DHA (n=5), sus controles (n=5) y ratones *wild-type* (n=4) recibieron una inyección intraperitoneal de insulina recombinante (0.0075 U/g peso corporal) y se tomaron muestras de sangre de su cola transcurridos 0, 15, 30, 45 y 60 minutos para la determinación de la glucemia usando el sistema Accu-Chek® Aviva de Roche Diagnostics GMBH.

2.3.- Sacrificio de los ratones *ob/ob*

Al finalizar los tratamientos, los ratones fueron sacrificados usando una mezcla de 0,1 mg ketamina/g peso corporal con 0,01 mg xilacina/g peso corporal por vía intraperitoneal. Se recogió sangre que se centrifugó durante 10 minutos a 3.000 *g* para la obtención de suero. El hígado de todos los individuos fue extraído y aclarado con DPBS^{-/-}, luego una porción de este órgano se fijó en formol al 10% para su posterior inclusión en parafina, otra porción se incluyó en OCT y, tras congelarlo en 2-metilbutano frío, se guardó a -80°C. El tejido adiposo se fijó en formol al 10% y se incluyó en parafina. Además, pequeños trozos de hígado, tejido adiposo y músculo se congelaron con nitrógeno líquido para su posterior análisis.

IV.- ESTUDIOS CON CÉLULAS

1.- Incubaciones de Raw 264.7 con DHA y su metabolito 17-HDHA

Las incubaciones se realizaron con macrófagos de la línea murina Raw 264.7 cultivados en flascos de 75 cm² con medio DMEM completo (ver tabla *medios de cultivo, apartado II.2* de esta sección).

Protocolo

Materiales:

- Medio DMEM sin suero (ver *apartado II.2*)
- Flascos 75 cm²
- DPBS^{-/-}
- Tubos de 15 mL de poliestireno
- BHT 2%

Procedimiento:

1. Plaquear las células Raw 264.7 en flascos de 75 cm² (6x10⁶ células/flascón) en medio DMEM sin suero y dejar que se adhieran durante 16 horas.
2. Lavar las células con DPBS^{-/-} y añadir DMEM sin suero.
3. Preparar las condiciones experimentales en un volumen final de 6 mL:
 - Vehículo (EtOH 0,5%) 2 y 24 horas
 - DHA 1 μM 2 y 24 horas
 - DHA 10 μM 2 y 24 horas
 - 17-HDHA 1 μM 2 y 24 horas
4. Incubar durante el tiempo correspondiente.
5. Recoger los sobrenadantes en tubos de 15 mL.
6. Centrifugar 5 min. a 1.500 *g*.

7. Salvar los sobrenadantes en tubos limpios, añadir a cada tubo 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de BHT 2% y congelar.
8. Extraer de las células el RNA o la proteína total (ver *apartados VI.1.1 y VII.1.1*).

2.- Ensayo Cometa

El ensayo cometa (*comet assay*) es una técnica utilizada para determinar el grado de daño en el DNA celular. Esta técnica se realizó en hepatocitos murinos CC-1 cultivados en flascos de 75 cm^2 con medio EMEM completo (ver *apartado II.2* de esta sección), siguiendo una adaptación de los métodos de Singh y Klaude (Singh *et al.*, 1988; Klaude *et al.*, 1996).

Protocolo

Materiales:

- EMEM sin suero (ver *apartado II.2*)
- Placas 60 mm
- H_2O_2
- DPBS^{-/-}
- Porta-objetos recubiertos de agarosa (1,5%)
- Tubos de 1,5 mL
- Agarosa de bajo punto de fusión (*Low Melting Agarose*)
- Cubre-objetos 24x24 mm y 24x60 mm
- Tampón de lisis (ver *apartado II.1*)
- Cubetas y cestillas de histología
- Tampón de electroforesis (ver *apartado II.1*)
- Tampón de neutralización (ver *apartado II.1*)
- Yoduro de propidio

Procedimiento:

1. Plaquear células CC-1 en placas de 60 mm (10^6 células/placa) en medio EMEM completo y dejar que se adhieran durante 16 horas.
2. Lavar las células con DPBS^{-/-} y añadir EMEM sin suero.
3. Preparar las condiciones experimentales en un volumen final de 3 mL:

Vehículo (EtOH 0,5%)

DHA 10 μ M

17-HDHA 1 μ M

4. Añadir también 200 μ M H₂O₂ en todas las placas e incubar durante 1 hora a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂.
5. Preparar LMA 0.5% (ver *Anexo*) y mantenerla a 37°C hasta su uso.
6. Tripsinizar las células de cada condición experimental y contarlas.
7. Preparar dos alícuotas con 50.000 células en DPBS^{-/-} para cada condición experimental en tubos de 1,5 mL.
8. Centrifugar las células 5 min. a 800 *g* a 4°C.

A partir de este momento, trabajar sin luz en la medida de lo posible.

9. Preparar las muestras una a una^(*): aspirar el DPBS^{-/-}, resuspender el *pellet* celular en 200 μ l de LMA 0,5% a 37°C y aplicar inmediatamente 100 μ l sobre un porta-objetos recubierto con agarosa y cubrir la gota que contiene las células con un cubre-objetos.

() Es importante manipular las muestras una a una para evitar que la agarosa solidifique en los tubos con las células porque esto implicaría perder la muestra.*

10. Dejar que las muestras solidifiquen durante 7 min. a 4°C.
11. Retirar con mucho cuidado los cubre-objetos.
12. Colocar las muestras en las cestillas de histología.
13. Sumergir las cestillas en buffer de lisis frío (4°C) (ver *Anexo*).

14. Lisar las células durante 1 hora a 4°C protegiendo las muestras de la luz con papel de aluminio.
15. Colocar la cubeta de electroforesis en una bandeja de plástico y rodearla de hielo.
16. Colocar las muestras en la cubeta de electroforesis teniendo cuidado con su orientación.
Todas las muestras deben correr al mismo tiempo.
17. Llenar la cubeta de electroforesis con el buffer de electroforesis frío (4°C) y dejar que las muestras se equilibren en este buffer durante 20 min.
18. Correr la electroforesis 15 min. a 300mA (ó 25 V).
19. Colocar las muestras en las cestillas de histología.
20. Sumergir las muestras en buffer de neutralización durante 5 min a T^a ambiente.
21. Sumergir las muestras en H₂O_d.
22. Secar las muestras 1 hora a 37-40°C.
23. Teñir las muestras con 40 µl de yoduro de propidio (20 µg/ml) y cubrirlas con cubre-objetos de 24x60 mm o guardarlas protegidas de la luz a 4°C hasta su tinción.
24. Visualizar las muestras con un microscopio de fluorescencia equipado con un filtro de excitación de 510-560 nm.
25. Evaluar el daño en el DNA en un total de 50 cometas de cada muestra. Para ello se establecen 5 categorías (0-4) según la intensidad relativa de la fluorescencia de la cola de los cometas. 0 representa a las células no dañadas y 4 a las células dañadas del modo más severo. Sumando la puntuación de cada uno de los cometas analizados de obtiene una medida del daño del DNA en unidades arbitrarias, que varía de 0 (todas las células intactas) hasta 200 (todas las células están extremadamente dañadas).

Anexo

Porta-objetos recubiertos de agarosa 1,5%: 150 mg agarosa

10 mL H₂O_d

Calentar la mezcla en el microondas para disolver la agarosa. Sumergir los porta-objetos en la solución de agarosa y dejar secar al aire. Guardar a 4°C.

LMA 0,5%: 50 mg Agarosa de bajo punto de fusión (*Low Melting Agarose*)

10 mL H₂O_d

Calentar el agua en un baño seco a 80°C y añadir luego la agarosa. Mezclar bien hasta que se disuelva completamente. Atemperar y mantener en el baño a 37°C para evitar que solidifique o queme las células.

Buffer de electroforesis: La solución de trabajo indicada en el *apartado II.1* se obtiene a partir de las soluciones *stock* NaOH 10 N y EDTA 200 mM guardadas a 4°C.

Seguridad

El yoduro de propidio es un quelante del DNA y como tal, debe usarse con máxima precaución. Cualquier elemento en contacto con el yoduro de propidio debe tratarse como contaminante citóxico. Rotular de manera visible indicando "Peligro, Yoduro de Propidio". Es obligatorio el uso de doble guante, bata y gafas.

3.- Medición de los niveles de estrés oxidativo (MDA)

Los niveles de MDA son un indicador de los niveles de estrés oxidativo. Mediante HPLC se determinó la concentración de MDA en lisados celulares de hepatocitos CC-1, cultivados en flascos de 75 cm² con medio EMEM completo (ver *apartado II.2* de esta sección), siguiendo el procedimiento de Halliwell (Halliwell *et al.*, 1993).

Protocolo

Materiales:

- EMEM sin rojo fenol y sin suero (ver *apartado II.2*)
- Placas 12 pozos
- H₂O₂

- MeOH
- Tubos vidrio 13x100 mm
- Ácido tricloroacético 0,3%
- Ácido fosfórico
- Ácido tiobarbitúrico

Procedimiento:

1. Plaquear células CC-1 en placas de 12 pozos (4×10^5 células/pozo) en medio EMEM completo y dejar que se adhieran durante 16 horas.
2. Lavar las células con DPBS^{-/-} y añadir EMEM sin rojo fenol sin suero.
3. Preparar las condiciones experimentales en un volumen final de 1 mL:
 - Vehículo (EtOH 0,5%)
 - DHA 10 μ M
 - 17-HDHA 1 μ M
4. Añadir también 200 μ M H₂O₂ en todas las placas e incubar durante 1 hora en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂ a 37°C.
5. Terminar la incubación añadiendo a cada placa 2 mL de MeOH a 4°C.
6. Raspar la superficie de las placas y recoger los lisados celulares en tubos de vidrio de 13x100 mm.
7. Evaporar los lisados celulares bajo un flujo de N₂.
8. Resuspender los extractos secos en DPBS^{-/-}.
9. Homogeneizar las muestras con ácido tricloroacético 0,3%.
10. Centrifugar las muestras 3 min. a 8.000 *g* a 4°C.
11. Añadir ácido fosfórico y tiobarbitúrico a los sobrenadantes y calentarlos durante 30 min. a 80°C.
12. Medir los niveles de MDA mediante HPLC.

4.- Ensayos de transactivación

Siguiendo un protocolo puesto a punto en nuestro laboratorio (López-Parra *et al.*, 2005), se realizaron ensayos de transactivación de PPAR γ para probar si los derivados de DHA, 7-HDHA, 14-HDHA, 17(\pm)-HDHA ó 17*R*-HDHA, tenían algún efecto sobre el receptor nuclear PPAR γ . Las transfecciones de los plásmidos (ver *apartado I.4* de esta sección y Figura 14) se realizaron con la línea COS-7, procedente del riñón del mono verde africano cultivada en flascos de 75 cm² en medio DMEM completo (ver tabla *medios de cultivo, apartado II.2* de esta sección).

Protocolo

Materiales:

- DMEM completo
- DMEM sin suero (ver *apartado II.2*)
- Placas 12 pozos
- Crío-viales
- Kit *Effectene Transfection Reagent* (Qiagen, Hilden, Germany)
- Kit *β -Gal Reporter Gene Assay* (Roche, Mannheim, Germany)
- Kit *Luciferase Reporter Gene Assay* (Roche)
- Plásmidos detallados en el *apartado I.4*
- Tubos de plástico de 13x100 mm

Procedimiento:

1. Plaquear células COS-7 en placas de 12 pozos (30x10³ células/pozo) en DMEM completo y dejar que se adhieran durante 16 horas a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂.
2. Transfectar las células con los plásmidos. Para ello hay que preparar una *mix* que contenga 0,3 μ g del plásmido MH100-tk-luc, 0,002 μ g del vector de expresión pCMV y

- 93 μL de *EC buffer* del kit *Effectene Transfection Reagent* para cada condición experimental.
3. Mezclar suavemente y repartir la *mix* de plásmidos en tantos crío-viales como condiciones experimentales.
 4. Añadir 0,1 μg del plásmido PPAR γ -GAL4 en todas las condiciones experimentales, excepto en el CT negativo del plásmido PPAR γ -GAL4.
 5. Añadir a cada crío-vial 48 μL de *EC buffer* (50 μL en el CT).
 6. Añadir 4,8 μL de *Enhancer* del kit *Effectene Transfection Reagent* en todos los crío-viales. Incubar 3 min. a T^a ambiente.
 7. Añadir 6 μL de *Effectene* del kit *Effectene Transfection Reagent* en el CT negativo del plásmido PPAR γ -GAL4 y 8 μL en el resto de condiciones experimentales. Incubar 10 min. a T^a ambiente.
 8. Lavar las células dos veces con DPBS^{-/-} y añadir 800 μL DMEM completo en cada pozo durante la incubación de los plásmidos con el reactivo *Effectene*.
 9. Añadir 800 μL de DMEM completo a cada crío-vial y mezclar el contenido.
 10. Repartir 475 μL de cada crío-vial a los dos pozos que corresponda.
 11. Incubar durante 40 horas a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂.
 12. Lavar las células dos veces con DPBS^{-/-}.
 13. Añadir DMEM sin suero en cada pozo. Incubar 1 hora a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂.
 14. Preparar las condiciones experimentales en DMEM sin suero:
 - Vehículo (EtOH 0,5%)
 - 7-HDHA 0,1; 1; 5 y 10 μM
 - 14-HDHA 0,1; 1; 5 y 10 μM
 - 17-HDHA 0,1; 1; 5 y 10 μM

17 β -HDHA 0,1; 1; 5 y 10 μ M

15-deoxi-PGJ₂ 0,5 μ M

15. Añadir los tratamientos de cada condición experimental. El volumen final de incubación es 1 mL.
16. Incubar 18 horas en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂ a 37°C.
17. Reconstituir en *Lysis buffer* del kit *Luciferase Reporter Gene Assay* y diluir a concentración x1.
18. Lavar las células dos veces con DPBS^{-/-}.
19. Añadir 150 μ L de *Lysis buffer* en cada pozo.
20. Raspar las células de los pozos.
21. Recoger el lisado de cada pozo en 2 alícuotas:
 - 30 μ L del lisado en un tubo de plástico de 13x100 mm para la determinación de luciferasa.
 - 60 μ L del lisado en un tubo de 1,5 mL para la determinación de β -galactosidasa.
22. Luciferasa: añadir 100 μ L de *Luciferase buffer* a los 30 μ L del lisado celular en el tubo de 13x100 mm y leer en el luminómetro. *Esta medida indica la actividad de PPAR γ .*
 β -galactosidasa: incubar los 60 μ L del lisado celular 1 hora a 50°C. Transferir 25 μ L a un tubo de plástico de 13x100 mm. Añadir 50 μ L de *Substrate reagent* (x1). Agitar 1 hora a T^a ambiente y leer en el luminómetro. *Esta medida indica la eficiencia de transfección de las células en el experimento.*

V.- EXPERIMENTOS *EX VIVO* CON EXPLANTES DE TEJIDO ADIPOSO

Los explantes de tejido adiposo fueron obtenidos del tejido adiposo epididimal de ratones *ob/ob* y se incubaron en las condiciones experimentales deseadas.

Protocolo

Materiales:

- Ketamina
- Xilacina
- Placas de 60 mm
- DPBS^{-/-}+penicilina/estreptomicina (ver composición en el *apartado II.2*)
- Tubos de 50 mL
- DMEM 0,5% BSA (ver composición en el *apartado II.2*)
- Placas 12 pozos
- Tubos vidrio 16x100 mm
- TRIzol

Procedimiento:

1. Pesar el animal y administrarle la anestesia.
2. Extirpar el tejido adiposo epididimal y colocarlo en una placa de 60 mm para pesarlo.
3. *A partir de este punto es imprescindible trabajar en condiciones estériles.* Llevar el tejido a la campana de flujo de laminar de la sala de cultivos. Transferir el tejido adiposo a una nueva placa de 60 mm que contenga DPBS^{-/-}+penicilina/estreptomicina precalentado a 37°C.
4. Cortar el tejido adiposo en trozos, eliminando los vasos sanguíneos y el tejido conectivo.
5. Tarar la balanza con una nueva placa de 60 mm con DPBS^{-/-}+penicilina/estreptomicina y pesar uno de los trozos de tejido adiposo, ajustándolo a 40 mg de peso.

6. Obtener tantos explantes como sean necesarios usando como referencia el primero que se ha pesado.
7. Introducir todos los explantes en un tubo de 50 mL con 40-45 mL de DPBS^{-/-} +penicilina/estreptomicina a 37°C.
8. Centrifugar 1 min. a 400 *g* para eliminar las células sanguíneas.
9. En una placa de 12 pozos, añadir 0,5 mL de medio DMEM 0,5% BSA en cada pozo.
10. Depositar un explante por pozo y dejar en el incubador mientras se preparan el tratamiento de cada condición experimental.
11. Preparar los tratamientos en tubos de vidrio (para hacer triplicados). Las condiciones experimentales son:
 - Vehículo (0,5% EtOH)
 - Protectina D1 100 nM
 - Protectina D1 250 nM
 - Rosiglitazone 10 μ M
12. Añadir los tratamientos a los explantes. El volumen final de incubación es 1 mL.
13. Incubar durante 12 horas.
14. Recuperar los explantes uno a uno, secarlos ligeramente, pesarlos y pasarlos a un tubo de vidrio que contenga 1 mL de TRIzol.
15. Homogeneizarlos y congelar a -80°C hasta la extracción de RNA (ver *apartado VI.1.1*).

VI.- ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA

1.- Extracción de RNA

1.1.- TRIzol

Este método fue utilizado para la extracción de RNA total a partir de células Raw 264.7 (flascón 75 cm² en confluencia), hígado (50 mg), tejido adiposo (100 mg), músculo esquelético (80 mg) y explantes de tejido adiposo (40 mg).

Protocolo

Materiales: *todo el material usado para esta técnica debe estar libre de RNAsas*

- *TRIzol Reagent* (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- Cloroformo
- Isoropropanol
- EtOH 75%
- H₂O libre de RNAsas
- Tubos vidrio 16x100 mm
- Tubos 1,5 mL

Procedimiento:

1. Homogeneizar la muestra. Células: añadir 1 mL del reactivo TRIzol directamente al flascón. Scrapear la superficie para desprender todas las células y pipetear repetidamente para lisarlas totalmente. Tejidos: añadir 1 mL de TRIzol al tejido en un tubo de vidrio y homogeneizar con el homogeneizador Ultra-Turrax.
2. Traspasar el homogenizado a un tubo de 1,5 mL y centrifugar 10 min. a 12.000 *g* a 4°C. Este paso permite descartar material insoluble con la formación de un *pellet*. En el caso del tejido adiposo este paso también permite eliminar la capa superior de grasa que puede interferir con la extracción del RNA.

3. Recuperar la fase rosa en un tubo limpio. Incubar 5 min. a T^a ambiente.
4. Añadir 200 µL de cloroformo y agitar vigorosamente durante 15 seg. Incubar 3 min. a T^a ambiente.
5. Centrifugar 10 min a 12.000 *g* a 4°C.
6. Recuperar la fase incolora en un tubo limpio. Es muy importante no recoger nada de la interfase porque es fuente de contaminación.
7. Añadir 500 µL de isopropanol, mezclar por inversión e incubar 10 min. a T^a ambiente.
8. Centrifugar 10 min a 12.000 *g* a 4°C.
9. Descartar en sobrenadante.
10. Lavar el *pellet* con 1 mL de EtOH 75% y vortear durante unos segundos.
11. Centrifugar 5 min. a 7.600 *g* a 4°C.
12. Descartar sobrenadante y dejar secar el *pellet*.
13. Resuspender el *pellet* seco en un volumen adecuado de H₂O libre de RNAsas.
14. Congelar a -80°C antes de su valoración para estabilizar el RNA.

Seguridad

Dado que el reactivo TRIzol contiene fenol, este procedimiento debe realizarse en una campana de extracción de gases, protegidos por una mampara, con guantes y bata.

1.2.- RNAqueous

Este método fue utilizado para la extracción de RNA total a partir de hígado (50 mg).

Protocolo

Materiales: *todo el material usado para esta técnica debe estar libre de RNAsas.*

- Tubos vidrio 16x100 mm
- Kit *RNAqueous* (Ambion, Austin, TX, USA)
- H₂O libre de RNAsas

Procedimiento:

1. Añadir 700 μL de *Lysis buffer* al tejido en un tubo de vidrio y homogenizar con el homogeneizador Ultra-Turrax.
2. Dejar en hielo hasta la espuma desaparezca.
3. Traspasar el homogenado a un tubo de 1,5 mL y centrifugar 3 min. a 16.100 *g* a 4°C. Este paso permite descartar material insoluble con la formación de un *pellet*. En el caso del tejido adiposo este paso también permite eliminar la capa superior de grasa que puede interferir con la extracción del RNA.
4. Calentar a 80°C una alícuota de *Elution Solution* (100 μl /muestra).
5. Recuperar el sobrenadante en un tubo limpio. Añadir 700 μL de *EtOH 64%*. Vortear.
6. Preparar un tubo con un filtro para cada muestra y aplicar en cada filtro 700 μL de la muestra.
7. Centrifugar 1 min. a 15.000 *g* a T^a ambiente.
8. Descartar el eluido del tubo.
9. Aplicar a cada filtro los 700 μL restantes de muestra y volver a centrifugar en las mismas condiciones.
10. Descartar el eluido del tubo.
11. Aplicar a cada filtro 700 μL de *Wash Solution#1*.
12. Centrifugar 1 min. a 15.000 *g* a T^a ambiente.
13. Descartar el eluido del tubo.
14. Aplicar a cada filtro 500 μL de *Wash Solution#2/3*.
15. Centrifugar 1 min. a 15.000 *g* a T^a ambiente.
16. Descartar el eluido.
17. Aplicar a cada filtro 500 μL de *Wash Solution#2/3*.
18. Centrifugar 1 min. a 15.000 *g* a T^a ambiente.

19. Centrifugar 30 seg. a 15.000 *g* a T^a ambiente para secar el filtro.
20. Poner un tubo limpio para eluir el RNA del filtro.
21. Aplicar en el centro de cada filtro 40 μ L de *Elution Solution* a 80°C.
22. Centrifugar 30 seg. a 15.000 *g* a T^a ambiente.
23. Aplicar en el centro de cada filtro 30 μ L de *Elution Solution* a 80°C.
24. Centrifugar 30 seg. a 15.000 *g* a T^a ambiente.
25. Congelar a -80°C antes de su valoración para estabilizar el RNA.

2.- Síntesis de cDNA

Se procedió a la obtención de cDNA mediante retrotranscripción acoplada a una reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) de los RNA obtenidos en el *apartado VI.1* utilizando los kits *AMV Reverse Transcriptase* (Promega, Madison, WI, USA) y *High capacity cDNA Archive* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) siguiendo las instrucciones del sendos fabricantes para reacciones de 25 μ L.

3.- PCR a tiempo real

Siguiendo las indicaciones de Applied Biosystems (Foster City, CA, USA), los ensayos de expresión génica TaqMan[®] *Gene Expression Assays (20x)* recogidos en el *apartado II.3*, junto al reactivo TaqMan[®] *Universal Master Mix (2x)* fueron usados para el análisis de la expresión génica mediante PCR a tiempo real con cDNA diluido 1/2 como molde en reacciones de 20 μ L.

VII.- ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA

1.- Extracción de proteínas

1.1.- Proteína total de Raw 264.7

Este método fue utilizado para la extracción de proteína total a partir de las células obtenidas en el *apartado IV.1* de esta sección.

Protocolo

Materiales:

- Tampón de lisis TLB (ver composición en el *apartado II.1*)
- Tubos 50 mL
- DPBS^{-/-}
- *Scrapers*
- Tubos 1,5 mL

Procedimiento:

1. Añadir 10 mL DPBS^{-/-} a 4°C al flascón y raspar las células con *scrapers*.
2. Recoger las células en un tubo de 50 mL.
3. Añadir 5 mL DPBS^{-/-} frío a 4°C y repasar con el scraper.
4. Recoger en el mismo tubo de 50 mL.
5. Centrifugar 5 min. a 800 *g* a T^a ambiente.
6. Aspirar el sobrenadante.
7. Lavar el *pellet* de células con 25 mL DPBS^{-/-}.
8. Centrifugar 5 min. a 800 *g* a T^a ambiente.
9. Aspirar DPBS^{-/-}.
10. Añadir 200 µL tampón de lisis completo (196 µL TLB + 4 µL Inhibidores de proteasas) a cada muestra y pasar a un tubo de 1,5 mL.

11. Vortear a velocidad máxima durante 5 min.
12. Dejar en hielo 30 min. (vortear a los 15 min.).
13. Centrifugar 5 min. a 1.700 *g*.
14. Salvar el sobrenadante en un tubo limpio.
15. Valorar la concentración (ver *apartado VII.2*) y congelar en alícuotas a -20°C .

1.2.- Proteína total de tejido

Este método fue utilizado para la extracción de proteína total a partir de hígado (50 mg), tejido adiposo (100 mg) y músculo esquelético (50 mg) de ratón.

Protocolo

Materiales:

- Tampón de homogeneización (ver composición en el *apartado II.1*. Añadir los inhibidores justo antes de su uso)
- Tubos vidrio 16x100 mm
- Tubos 1,5 mL

Procedimiento:

1. Añadir tampón de homogeneización al tejido en una proporción 6:1 en un tubo de vidrio y homogeneizar con el homogeneizador Ultra-Turrax.
2. Incubar los homogenados en hielo durante 15 min, vorteadando las muestras cada 5 min.
3. Pasar los homogenados a tubos de 1,5 mL.
4. Centrifugar 20 min. a 16.100 *g* a 4°C .
5. Salvar el sobrenadante en un tubo limpio.
6. Valorar la concentración de proteína (ver *apartado VII.2*) y congelar en alícuotas a -20°C .

2.- Cuantificación de proteína

2.1.- Bradford

Este método de cuantificación fue utilizado para la valoración de la proteína extraída de células Raw 264.7.

Protocolo

Materiales:

- BSA 10 mg/mL
- Reactivo de Bradford
- Tubos vidrio 16x100 mm
- Tubos 1,5 mL

Procedimiento:

1. Preparar las diluciones de las muestras (en general 1/100, 1/500). El volumen preparado debe ser suficiente para hacer replicados.
2. Preparar la recta patrón con los siguientes puntos ($\mu\text{g/mL}$): 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56 y 0 a partir de la BSA 10 mg/mL. Es importante usar el mismo tampón que contengan las muestras, en la dilución más concentrada. El volumen preparado debe ser suficiente para hacer replicados.
3. Añadir el reactivo de Bradford a la patrón y a las muestras.
4. Medir la absorbancia a 495 nm.

2.2.- Micro BCA

Este método de cuantificación fue utilizado para la valoración de la proteína extraída de tejido de ratón.

Protocolo

Materiales:

- BSA 2 mg/mL

- Kit *MicroBCATM Protein Assay* (Pierce, Rockford, IL, USA)
- Tubos vidrio 16x100 mm
- Placa de 96 pozos

Procedimiento:

1. Preparar las diluciones de las muestras (en general 1/300, 1/600). El volumen preparado debe ser suficiente para hacer replicados.
2. Preparar la recta patrón con los siguientes puntos ($\mu\text{g/mL}$): 40; 20; 10; 5; 2,5; 1; 0,5 y 0 a partir de la BSA 2 mg/mL. Es importante usar el mismo tampón que contengan las muestras, en la dilución más concentrada. El volumen preparado debe ser suficiente para hacer replicados.
3. Preparar *Working Reagent* mezclando los reactivos A:B:C en una proporción 25:24:3, teniendo en cuenta los replicados.
4. Añadir 150 μL de la patrón y las muestras en la placa de 96 pozos.
5. Añadir 150 μL de *Working Reagent* a cada pozo.
6. Incubar a 37°C durante 2 horas.
7. Dejar recuperar la Tª ambiente.
8. Medir la absorbancia a 562 nm.

3.- Western Blot

3.1.- Detección de 5-LO

Esta técnica se realizó como se había descrito previamente (Titos *et al.*, 2005) con los extractos de proteína total obtenidos en el *apartado VII.1.1.*

Protocolo

Materiales:

- Acrilamida/Bis 40%
- APS 10%
- H₂O_d
- TEMED
- SDS 10%
- *Upper y Lower buffer* (ver *apartado II.1*)
- Tampón de electroforesis x10 (ver *apartado II.1*)
- Tampón de carga de *Laemmli* x6 (ver *apartado II.1*)
- Marcador de peso molecular *Kaleidoscope* (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Tampón de transferencia x10 (ver *apartado II.1*)
- MeOH
- Papel de filtro *Mini-TransBlot*
- Membranas de PVDF
- *Ponceau*
- TBS (ver composición en el *apartado II.1*)
- Anticuerpo primario anti-5LO (ver *apartado II.3*)
- Anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con HRP
- Kit ECL (*Enhanced Chemiluminescence*, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK)

Procedimiento:

1. Preparar el gel de resolución (12,5%) y el gel de *stacking*.

Resolución, 1 gel 1,5 mm:

3,12 mL Acrilamida/Bis 40% + 2,5 mL *Lower buffer* + 4,21 mL H₂O_d + 100 µL SDS 10% + 60 µL APS 10% + 5 µL TEMED.

Stacking:

0,9 mL Acrilamida/Bis 40% + 1,2 mL *Upper buffer* + 7,22 mL H₂O_d + 100 µL SDS 10% + 570 µL APS 10% + 5 µL TEMED.

2. Preparar alícuotas de 30 µg de proteína total de las muestras en tampón de carga de *Laemmli* (concentración final x1) y calentarlas 5 min. a 95°C.
3. Preparar 1 L de tampón de electroforesis x1 y llenar la cubeta con los geles dentro.
4. Cargar las muestras en los respectivos pozos de los geles.
5. Correr electroforesis: 10 min. a 150 V y 1 hora a 120 V.
6. Preparar 1L de tampón de transferencia x1 (700 mL H₂O_d + 200 mL MeOH + 100 mL tampón transferencia x10).
7. Desmontar la electroforesis, retirar de los geles la parte de *stacking* y dejarlos en tampón de transferencia x1 durante 15 min.
8. Activar las membranas de PVDF: 15 seg. en MeOH + 2 min. en H₂O_d + 5 min. en tampón de transferencia x1.
9. Montar las *cassettes* de transferencia con el gel, la membrana, el papel de filtro *Mini-TransBlot* y las esponjas. Transferir las proteínas del gel a la membrana de PVDF *overnight* a 40 V y a 4°C.
10. Teñir las membranas con *Ponceau* para comprobar la transferencia. Si es necesario, cortarlas para las incubaciones sucesivas.
11. Bloquear las membranas durante 1 hora con TBS 0,05% Tween 20 y 5% leche desnatada en polvo.

12. Lavar las membranas 5 min. con TBS 0,05% Tween 20 (2 veces).
13. Incubar con el anticuerpo primario policlonal anti-5-LO (dilución 1/1000 en TBS 0,05% Tween 20 y 1% de leche desnatada en polvo) durante 2 horas a Tª ambiente.
14. Lavar las membranas 5 min. con TBS 0,05% Tween 20 (2 veces).
15. Incubar con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con HRP (dilución 1/2000 en TBS 0,05% Tween 20 y 1% leche desnatada polvo) durante 1 hora a Tª ambiente.
16. Lavar las membranas 5 min. con TBS 0,05% Tween 20 (2 veces).
17. Incubar con ECL y visualizar.

3.2.- Detección de AMPK total y AMPK fosforilada

Esta técnica se realizó con los extractos de proteína total obtenidos en el *apartado*

VII.1.2.

Protocolo

Materiales:

- Acrilamida/Bis 40%
- APS 10%
- H₂O_d
- TEMED
- SDS 10%
- *Upper y Lower buffer* (ver *apartado II.1*)
- Tampón de electroforesis x10 (ver *apartado II.1*)
- Tampón de carga de *Laemmli* x6 (ver *apartado II.1*)
- Marcador de peso molecular *Rainbow* (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK)

- Tampón de transferencia x10 (ver *apartado II.1*)
- MeOH
- Papel de filtro *Mini-TransBlot*
- Membranas de PVDF
- *Ponceau*
- TBS (ver *apartado II.1*)
- Tampón de *stripping* (ver *apartado II.1*)
- Anticuerpo primario anti-AMPK total (ver *apartado II.3*)
- Anticuerpo primario anti-APMK fosforilada (ver *apartado II.3*)
- Anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con HRP
- Kit ECL (*Enhanced Chemiluminescence*, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK)

Procedimiento:

1. Preparar el gel de resolución (12,5% para las muestras de hígado y músculo, y 10% para las de tejido adiposo) y el gel de *stacking*.

Resolución 12,5%, para 1 gel 1,5 mm:

3,12 mL Acrilamida/Bis 40% + 2,5 mL *Lower buffer* + 4,21 mL H₂O_d + 100 µL SDS 10% + 60 µL APS 10% + 5 µL TEMED.

Resolución 10%, para 1 gel de 1,5mm:

2,5 mL Acrilamida/Bis 40% + 2,5 mL *Lower buffer* + 4,83 mL H₂O_d + 100 µL SDS 10% + 60 µL APS 10% + 5 µL TEMED.

Stacking:

0,9 mL Acrilamida/Bis 40% + 1,2 mL *Upper buffer* + 7,22 mL H₂O_d + 100 µL SDS 10% + 570 µL APS 10% + 5 µL TEMED.

2. Preparar alícuotas de 50 µg de proteína total de las muestras de hígado, 80 µg de las de tejido adiposo y 100 µg de las de músculo esquelético en tampón de carga de *Laemmli* (concentración final x1) y calentarlas 5 min. a 95°C.
3. Preparar 1 L de tampón de electroforesis x1 y llenar la cubeta con los geles dentro.

4. Cargar las muestras en los respectivos pozos de los geles.
5. Correr electroforesis: 100 min. a 120 V.
6. Preparar 1L de tampón de transferencia x1 (700 H₂O_d + 200 MeOH + 100 tampón transferencia x10).
7. Desmontar la electroforesis, retirar de los geles la parte de *stacking* y dejarlos en tampón de transferencia x1 durante 15 min.
8. Activar las membranas de PVDF: 15 seg. en MeOH + 2 min. en H₂O_d + 5 min. en tampón de transferencia x1.
9. Montar las *cassettes* de transferencia con el gel, la membrana, el papel de filtro *Mini-TransBlot* y las esponjas. Transferir las proteínas del gel a la membrana durante 2 horas a 100 V y a 4°C.
10. Teñir las membranas con *Ponceau* para comprobar la transferencia. Si es necesario, cortarlas para las incubaciones sucesivas.
11. Bloquear las membranas durante 1 hora con TBS 0.1% Tween 20 y 5% leche desnatada en polvo.
12. Lavar las membranas 5 min. con TBS con 0,1% Tween 20 (3 veces).
13. Incubar con el anticuerpo primario anti-AMPK fosforilada (dilución 1/1000 en TBS 0,1 % Tween 20 y 5% BSA) *overnight* a 4°C.
14. Lavar las membranas 5 min. con TBS 0,1% Tween 20 (3 veces).
15. Incubar con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con HRP (dilución 1/2000 en TBS 0,1% Tween 20 y 5% leche desnatada en polvo) durante 1 hora a T^a ambiente.
16. Lavar las membranas 5 min. con TBS 0,1% Tween 20 (3 veces).
17. Incubar con ECL y visualizar.
18. Incubar durante 20 min con tampón de *stripping*.

19. Lavar las membranas 5 min. con TBS 0,1% Tween 20 (3 veces).
20. Bloquear las membranas durante 1 hora con TBS 0.1% Tween 20 y 5% leche desnatada en polvo.
21. Lavar las membranas 5 min. con TBS 0,1% Tween 20 (3 veces).
22. Incubar con el anticuerpo primario anti-AMPK (dilución 1/1000 en TBS 0,1 % Tween 20 y 5% BSA) *overnight* a 4°C.
23. Lavar las membranas 5 min. con TBS 0,1% Tween 20 (3 veces).
24. Incubar con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con HRP (dilución 1/2000) durante 1 hora a Tª ambiente.
25. Lavar las membranas 5 min. con TBS 0,1% Tween 20 (3 veces).
26. Incubar con ECL y visualizar.

4.- Inmunohistoquímica para la detección de F4/80

Esta técnica fue realizada para la detección de la proteína de membrana F4/80 específica de macrófago en secciones de 3,5 µm de grosor de hígado ratón incluido en parafina. Poner 3 secciones de la misma muestra en cada porta-objetos. Dejar secar las muestras a 37°C durante 24 horas.

Protocolo

Materiales:

- Batería de desparafinación (xileno, EtOH 100%, 70%, 50% y H₂O_d)
- Lápiz hidrofóbico
- BSA
- H₂O₂ 3%
- Anticuerpo primario rata anti-F4/80 de ratón (ver *apartado II.3*)
- Anticuerpo secundario anti-rata biotinilado

- Solución de exposición del antígeno (ver *apartado II.1*)
- Kit ABC (Vector, Burlingame, CA, USA)
- Kit DAB (Dako, Carpinteria, CA, USA)
- PBS
- Hematoxilina de Mayer
- DPX
- Cubre-objetos 24x60 mm

Procedimiento:

NOTA: Usar las cámaras húmedas para las incubaciones y las jarras de Coplin para los lavados. Las muestras no deben secarse nunca. Para las incubaciones *overnight* es recomendable colocar pequeños trozos de papel parafinado sobre las incubaciones, para evitar su evaporación.

1. Desparafinar e hidratar las muestras en la batería de xileno/alcoholes: 10 min. xileno (1) + 5 min. xileno (2) + 5 min. EtOH 100% (1) + 5 min EtOH 100% (2) + 5 min EtOH 70% (1) + 5 min EtOH 70% (2) + 5 min EtOH 50%+ 5 min H₂O_d.
2. Delimitar con el lápiz hidrofóbico el área de incubación alrededor de cada corte de tejido para minimizar el volumen necesario para cada incubación (en general, una vez hecho esto 50-80 µL de reactivo serán suficientes para cada corte de tejido).
3. Incubar las muestras con la solución de exposición del antígeno durante 20 min. a 37°C.
4. Dejar que recupere la T^a ambiente.
5. Lavar con PBS dos veces.
6. Incubar con H₂O₂ 3% durante 25 min. a T^a ambiente para bloquear de la peroxidasa endógena.
7. Lavar con PBS dos veces.

8. Incubar con PBS con 2% BSA durante 20 min. a T^a ambiente para bloquear las uniones inespecíficas del anticuerpo primario.
9. Escurrir el exceso de líquido sin lavar.
10. Incubar las muestras con el anticuerpo primario (dilución 1/100 en PBS con 1% BSA) *overnight* a 4°C. Para los controles negativos de cada muestra poner BSA 2% en vez de anticuerpo.
11. Lavar con PBS dos veces.
12. Incubar las muestras con el anticuerpo secundario biotinilado (dilución 1/200 en PBS con 1% BSA) durante 90 min. a T^a ambiente. Poner anticuerpo también en los controles negativos.
13. Lavar con PBS dos veces.
14. Incubar con el reactivo ABC durante 45 min a T^a ambiente.
15. Lavar con PBS dos veces.
16. Incubar las secciones protegiéndolas de la luz con el reactivo DAB (revelador del anticuerpo secundario) durante 5 minutos a T^a ambiente. Hacer las muestras de dos en dos para que no se pase la reacción y el tejido quede demasiado teñido.
17. Detener la reacción con H₂O_d y mirar la tinción en el microscopio. Si no fuera visible, volver a incubar con el reactivo DAB unos minutos más.
18. Lavar con H₂O_d dos veces.
19. Contrateñir con hematoxilina de Mayer durante 1 min.
20. Lavar con agua corriente hasta que la hematoxilina vire de color.
21. Deshidratar en la batería de xileno/alcoholes (orden inverso al del paso 1, saltando el H₂O_d)
22. Montar con cubre-objetos de 24x60 mm y DPX y dejar secar *overnight*.

23. Visualizar con un microscopio Nikon Eclipse E600. El software AnalSYS Soft Imaging System permite hacer la cuantificación automática del área teñida positivamente.

5.- Inmunofluorescencia para la detección de adiponectina

Este protocolo detecta la proteína adiponectina en secciones de 3,5 μm de tejido adiposo incluido en parafina. Poner 3 secciones de la misma muestra en cada porta-objetos. Dejar secar las muestras a 37°C durante 24 horas.

Protocolo

Material:

- Porta-objetos SuperFrost
- PBS x1
- H₂O_d
- Tripsina (*Type II*)
- BSA
- CaCl₂
- Xileno
- EtOH 100%
- Lápiz hidrofóbico
- Anticuerpo primario conejo anti-adiponectina (ver *apartado II.3*)
- Anticuerpo secundario asno anti-conejo marcado con AlexaFluor 488
- *ProLong Gold* con DAPI (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)
- Cubre-objetos (24x60 mm)

Procedimiento:

NOTA: Usar las cámaras húmedas para las incubaciones y las jarras de Coplin para los lavados. Las muestras no deben secarse nunca. Para las incubaciones *overnight* es recomendable colocar pequeños trozos de papel parafinado sobre las incubaciones, para evitar su evaporación.

1. Desparafinar e hidratar las muestras en la batería de xileno/alcoholes: 10 min xileno (1) + 5 min xileno (2) + 5 min EtOH 100% (1) + 5 min EtOH 100% (2) + 5 min EtOH 70% (1) + 5 min EtOH 70% (2) + 5 min EtOH 50%+ 5 min H₂O_d.
2. Delimitar con el lápiz hidrofóbico el área de incubación alrededor de cada corte de tejido para minimizar el volumen necesario para cada incubación (en general, una vez hecho esto 50-80 µL de reactivo serán suficientes para cada corte de tejido).
3. Incubar las muestras con la solución de exposición del antígeno (*ver apartado II.1*) durante 20 min. a 37°C.
4. Lavar con PBS dos veces.
5. Incubar con PBS con 2% BSA durante 20 min. a T^a ambiente para bloquear las uniones inespecíficas del anticuerpo primario.
6. Escurrir el exceso de líquido sin lavar.
7. Incubar con el anticuerpo primario (1/500 en PBS con 1% BSA) *overnight* a 4°C. Para los controles negativos de cada muestra poner BSA 2% en vez de anticuerpo.
8. Lavar con PBS dos veces.
9. Incubar 90 min a T^a ambiente con el anticuerpo secundario (1/400 en PBS con 1% BSA). Poner anticuerpo también en los controles negativos.
10. Lavar con PBS dos veces.
11. Deshidratar las muestras con la misma batería de xileno/alcoholes (orden inverso al paso 1, saltando el H₂O_d).

12. Eliminar bien el exceso de humedad del porta-objetos antes de montar la muestra.
13. Añadir 3 gotas de *ProLong Gold* con DAPI en un cubre-objetos (24x60mm) y aplicarlo sobre el porta-objetos.
14. Dejar las muestras montadas sobre una superficie plana y seca durante 24 horas a Tª ambiente. Si es necesario visualizar brevemente la preparación antes de que transcurra este periodo, sellar las esquinas del cubre-objetos (solamente) con laca de uñas.
15. Sellar los bordes del cubre-objetos con laca de uñas.
16. Guardar las muestras a -20°C protegidas de la luz.
17. Visualizar con un microscopio de fluorescencia Leica DMI 6000. Alexa Fluor488 marca la adiponectina de verde y los núcleos celulares se tiñen con el azul del DAPI. Para hacer la cuantificación es necesario eliminar el *background* de cada muestra usando un tiempo de exposición que elimine la señal del control negativo y permita ver sólo la señal correspondiente a la adiponectina.

VIII.- LÍPIDOS

1.- Extracción de lípidos de tejido

Este método fue utilizado para la extracción de lípidos totales a partir de hígado (50 mg) de ratón.

Protocolo

Materiales:

- Tubos vidrio con tapón de rosca de 10 y 50 mL
- Hexano/isopropanol (ver *apartado II.1*)
- Sulfato de sodio 0,47 M (anhidro)
- Colato de sodio 0,5% (peso/vol.)

- Pipetas *pasteur* de vidrio
- Tubos de 1,5 mL
- EtOH 70%
- H₂O_d

Procedimiento:

1. Añadir 10 mL de la mezcla hexano/isopropanol en los tubos de vidrio y añadir el tejido congelado y homogenizar con el homogeneizador Ultra-Turrax.
2. Cerrar los tubos fuertemente y colocar parafilm alrededor del tampón para evitar pérdidas de volumen.
3. Agitar el la noria *overnight* a T^a ambiente.
4. Añadir 3 mL sulfato de sodio 0,47 M a cada tubo y volver a cerrar fuertemente los tubos con parafilm.
5. Centrifugar 5 min. a 10.000 rpm a T^a ambiente.
6. Descartar la fase superior aspirándola con una *pasteur* de vidrio.
7. Transferir la fase inferior a un tubo de vidrio de 10 mL.
8. Evaporar esta fase bajo un flujo de N₂. Los extractos secos se pueden conservar a – 80°C.
9. Resuspender el extracto seco en 500 µL de colato de sodio 0,5% vorteando hasta que el quede completamente resuspendido.
10. Cuantificar el contenido de TG de las muestras.

2.- Extracción de eicosanoides

2.1.- Para análisis inmunoenzimático (EIA)

Este método, fue utilizado para la extracción de eicosanoides de hígado de ratón (200 mg). Posteriormente, con estos extractos se analizaron los niveles de PGE₂ mediante EIA.

Protocolo

Materiales:

- Tubos de vidrio de 16x100 mm y 13x100 mm
- DPBS con Ca²⁺ y Mg²⁺
- Tubos de 1,5 mL
- Cartuchos Sep-Pak (Waters, Mildford, MA, USA)
- Jeringas de 10 mL sin aguja
- MeOH
- H₂O_d
- Hexano
- Metilformiato

Procedimiento:

1. Homogenizar las muestras, manteniéndolas a 4°C, en 0,5 mL de DPBS con Ca²⁺ y Mg²⁺ con el homogeneizador Ultra-Turrax.
2. Traspasar los homogenados a tubos de 1,5 mL, añadiendo 0,5 mL de DPBS con Ca²⁺ y Mg²⁺.
3. Centrifugar los homogenados 10 min. a 400 *g* a 4°C.
4. Recuperar los sobrenadantes en tubos de vidrio de 13x100 mm y añadir H₂O_d a 4°C hasta 10 mL.
5. Ajustar las muestras a pH: 3,5 con HCl. Medir pH con tiras reactivas.

6. Montar la cubeta de extracción: acoplar una jeringa a cada cartucho y debajo colocar tubos para recoger los desechos.
7. Activar los cartuchos de extracción de fase sólida Sep-Pak eluyendo 20 mL MeOH, seguidos de 20 mL H₂O_d, asegurando que no llegue aire a ninguno de los cartuchos.
8. Eluir las muestras.
9. Lavar los cartuchos con 10 mL H₂O_d.
10. Eluir 10 mL de hexano, descartándolo.
11. Colocar tubos limpios para recoger la siguiente fase.
12. Eluir 8 mL de metilformiato (esta fase contiene los LTs y las PGs).
13. Evaporar el metilformiato bajo un flujo de N₂.
14. Resuspender los extractos secos en 1 mL de MeOH.
15. Conservar a -80°C hasta su análisis.

2.2.- Para análisis lipidómico

Este método, descrito por Gronert (Gronert *et al.*, 2005) fue utilizado para la obtención de eicosanoides a partir de hígado y tejido adiposo (200 mg) de ratón. Posteriormente, estos extractos se sometieron a análisis lipodómico mediante GC/MS/MS.

Protocolo

Materiales:

- Tubos de vidrio de 16x100 mm y 13x100 mm
- LTB₄ deuterado
- MeOH/H₂O_d (ver *apartado II.1*)
- Tubos de poliestireno de 15 mL
- Cartuchos Sep-Pak (Waters, Mildford, MA, USA)
- Jeringas de 10 mL sin aguja

- MeOH
- H₂O_d
- Hexano
- Metilformiato

Procedimiento:

1. Añadir el tejido a un tubo de vidrio con 5 mL de MeOH/H₂O_d a 4°C.
2. Añadir a cada muestra 200 pg de LTB₄ deuterado, como estándar interno.
3. Homogenizar las muestras manteniéndolas a 4°C con el homogeneizador Ultra-Turrax.
4. Dejar a -20°C durante 1 hora.
5. Transferir los homogenados a tubos de poliestireno de 15 mL.
6. Centrifugar 10 min. a 400 *g* a 4°C.
7. Recuperar los sobrenadantes en tubos de vidrio 13x100 mm y añadirles H₂O_d a 4°C hasta 10 mL.
8. Ajustar las muestras a pH: 3,5-4 con HCl. Medir pH con tiras reactivas.
9. Montar la cubeta de extracción: acoplar una jeringa a cada cartucho y debajo colocar tubos para recoger los desechos.
10. Activar los cartuchos de extracción de fase sólida Sep-Pak eluyendo 20 mL MeOH, seguidos de 20 mL H₂O_d, asegurando que no llegue aire a ninguno de los cartuchos.
11. Eluir las muestras.
12. Lavar los cartuchos con 10 mL H₂O_d.
13. Eluir 10 mL de hexano, descartándolo.
14. Colocar tubos limpios para recoger la siguiente fase.
15. Eluir 8 mL de metilformiato (esta fase contiene los LTs y las PGs).
16. Evaporar el metilformiato bajo un flujo de N₂.

17. Resuspender los extractos secos en 1 mL de MeOH.

18. Conservar a -80°C hasta su análisis.

Anexo 2: Otras publicaciones

New Approaches to the Modulation of the Cyclooxygenase-2 and 5-Lipoxygenase Pathways

A. González-Pérez and J. Clària*

Department of Biochemistry and Molecular Genetics, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona School of Medicine, Barcelona 08036, Spain

Abstract: The eicosanoid family comprises a number of biologically active lipid mediators involved in the regulation of inflammation and cancer cell growth. Eicosanoid biosynthesis is usually initiated by the release of arachidonic acid (AA) from membrane phospholipids in response to the interaction of a phospholipase-A₂ (PLA₂) stimulus with a receptor on the cell membrane. The free released AA is subsequently metabolized by three major enzymatic pathways: the cyclooxygenase (COX), lipoxygenase (LO) and cytochrome P450-dependent pathways. The COX pathway transforms AA into prostaglandins (PGs) and is of particular clinical relevance because it is the main target for non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). Of interest, COX-2, one of the two COX isoforms, is primarily involved in inflammation and cancer and for this reason selective COX-2 inhibitors have been developed. The efficacy of these compounds is similar to that of traditional NSAIDs but with a lower risk of gastrointestinal toxicity and bleeding. On the other hand, emerging information has recognized the role of other AA metabolites derived from the 5-LO pathway, the leukotrienes (LTs), in mediating and maintaining inflammation. Consequently, drugs able to inhibit 5-LO are now included among the effective pharmacological therapies, especially in asthma and allergic inflammation. Moreover, COX-2 and 5-LO pathways appear to act in parallel in the regulation of cell proliferation and neo-angiogenesis and both COX-2 and 5-LO inhibitors are being investigated as potential anticancer drugs. This review article will update the progress achieved in the knowledge of COX-2 and 5-LO and discuss the emerging approaches for the pharmacological modulation of these pathways.

THE CYCLOOXYGENASE PATHWAY

Cyclooxygenase (COX) is the key enzyme in the biosynthesis of prostaglandins (PGs) from arachidonic acid [1-3]. COX sequentially transforms arachidonic acid into PGG₂ and subsequently into PGH₂, which is finally converted by specific synthases into PGs of the D₂, E₂, F₂ and I₂ series as well as into thromboxane (TX) A₂ (Fig. (1)). The biosynthesis of COX products is cell specific and any given cell type tends to specialize in the formation of one of these eicosanoids as its major product. For example, endothelial cells mainly produce PGI₂ (prostacyclin) from PGH₂ by means of PGI synthase, and platelets release TXA₂ from PGH₂ through the action of TX synthase. Both PGI₂ and TXA₂ have a very short half-life and are rapidly hydrolyzed to the inactive compounds 6-keto-PGF_{1α} and TXB₂, respectively (Fig. (1)) [1-3]. PGH₂ can be alternatively converted to PGF_{2α} by PGF synthase, which is mainly expressed in the uterus or to PGD₂ by the action of PGD synthase, which is highly expressed in mast cells. PGD₂ is readily dehydrated to the cyclopentenone PGs of the J₂ series (PGJ₂ and 15-deoxy-Δ^{12,14}-PGJ₂ (15d-PGJ₂)) (*vide infra*). Finally, PGE₂ is formed by the enzyme PGE synthase (PGES) in virtually every cell type. Interestingly, PGES exists in three different isoforms: mPGES-1, cPGES-1 and mPGES-2. Among them, mPGES-1 was the first to be identified and characterized and has received the most attention since it is an inducible isoform functionally linked with COX-2 [4-8]. Accordingly, drugs

specifically targeting mPGES-1 are currently under development.

Formation of PGs has been detected in almost every tissue and body fluid. With the exception of seminal fluid, PGs are not stored in tissues or cells. Instead, once synthesized, they are released and/or exported to the extracellular space. Owing to instability, PGs and TX exert their functions mainly in the proximity of their sites of synthesis. Thus, they typically act as autocrine or paracrine hormones, maintaining homeostasis within their cells of origin or in neighboring cells in the tissue. The biological effects of PGs are mediated by ten different types and subtypes of receptors, which belong to the G protein-coupled rhodopsin-type receptor superfamily of seven transmembrane domains. Four of the receptor subtypes bind PGE₂ (EP1, EP2, EP3 and EP4), two bind PGD₂ (DP1 and DP2), two bind TXA₂ (TPα and TPβ) and the rest are single receptors for PGF_{2α} and PGI₂ (FP and IP, respectively) [9]. It has become clear that in addition to these classical membrane receptors, PGs can also transduce signals upon direct ligand binding to nuclear receptors such as peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs). These receptors are found in three different isoforms (i.e. PPARα, PPARδ and PPARγ) and act as ligand-activated transcription factors with a DNA binding domain that recognizes response elements in the promoter region of specific target genes linked to inflammation, cell proliferation, apoptosis and differentiation [10].

PGs exert a broad spectrum of biological activities in both physiological and pathological conditions. PGs play a major role in inflammation and participate in the regulation of smooth muscle tone, hemostasis, thrombosis, parturition

*Address correspondence to this author at the Department of Biochemistry and Molecular Genetics, Hospital Clínic, Villarroel 170, Barcelona 08036, Spain; Tel: 34-93-2275400; Ext: 2814; Fax: 34-93-2275454; E-mail: jclaria@clinic.ub.es

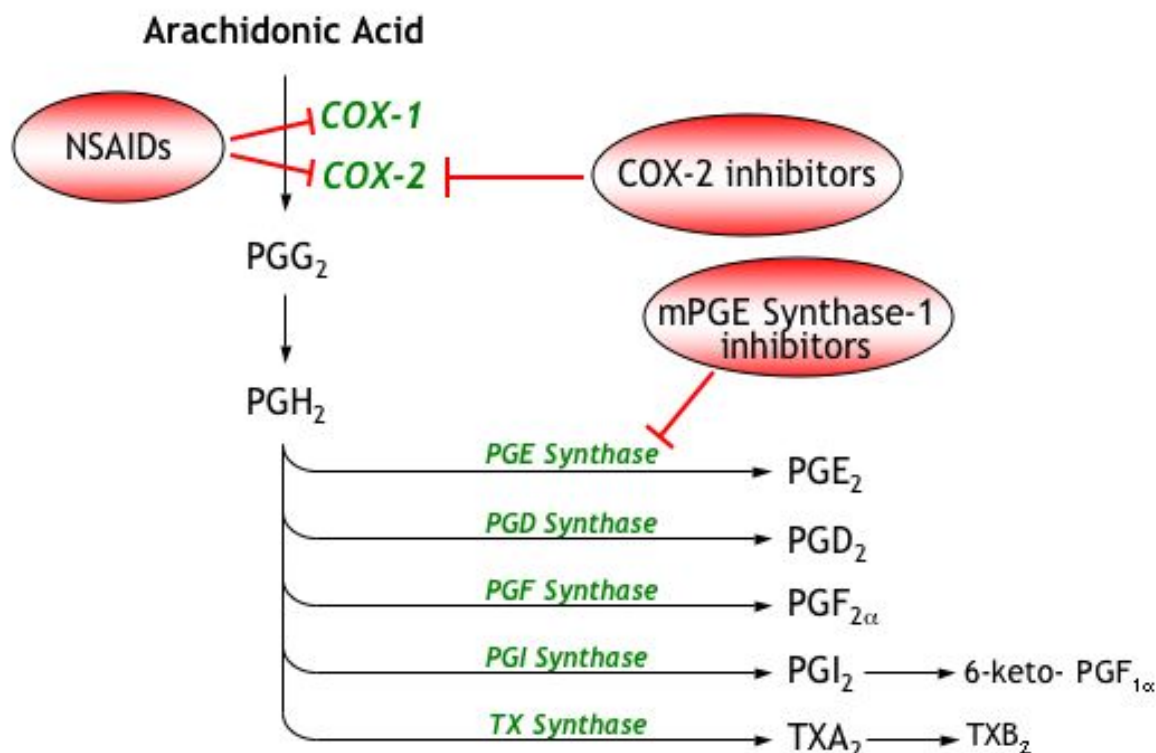


Fig. (1). The cyclooxygenase (COX) pathway. There are two different COX isoforms (COX-1 and COX-2) that transform arachidonic acid into prostaglandin (PG) G₂, which is further reduced to PGH₂. PGH₂ is a highly unstable endoperoxide that is rapidly converted by specific synthases to PGs of the E₂, D₂ and F₂ series and also to PGI₂ (prostacyclin) and thromboxane (TX) A₂. Both PGI₂ and TXA₂ have a very short half-life and are rapidly hydrolyzed to the inactive compounds 6-keto-PGF_{1α} and TXB₂, respectively. At the pharmacological level, the COX pathway can be modulated by non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), selective COX-2 inhibitors and a new emerging class of mPGE synthase-1 inhibitors.

and protection of gastrointestinal and renal integrity. Moreover, PGs, especially those derived from COX-2, play a major role in the progression of cancer.

COX-2

COX-2 was identified as an additional COX isoform, which unlike the constitutive isoform COX-1, is inducible and belongs to the category of immediate early genes [11-13]. The COX-2 gene is localized in chromosome 1, is about 8 kb long, has 10 exons and is transcribed as 4.6, 4.0 and 2.8 kb mRNA variants [14,15]. The cDNA for COX-2 encodes a polypeptide, which, before cleavage of the signal sequence, contains 604 amino acids with an apparent molecular mass of 70 kDa [14,16]. Sequence analysis of the COX-2 5'-flanking region has revealed several potential transcription regulatory elements including a TATA box, a NF-IL-6 motif, two AP-2 sites, three Sp1 sites, two NF-κB sites, a Cre motif and an E-box [reviewed in references 15,17]. COX-2 was originally identified as a unique, inducible gene product in studies addressing cell growth signaling pathways as well as in investigations on COX activity in response to cytokines and other inflammatory factors [reviewed in references 18 and 19]. In fact, COX-2 is markedly induced by interleukin (IL)-1 α and β, tumor necrosis factor (TNF) α, interferon (IFN) γ, LPS, epidermal growth factor, platelet-derived growth factor, fibroblast growth factor and oncogenes (v-src

and v-ras) [18,19]. Induction of COX-2 has been reported in many cell types including fibroblasts, monocytes and macrophages, epithelial, endothelial, smooth muscle, mesangial and mast cells, synoviocytes, osteoblasts and central nervous system neurons [18,19].

COX-2 AND CANCER

The first evidence connecting PGs with cancer were obtained from the observation that PGE₂ levels were increased in human colon tumors as compared to those of normal colon tissue [20]. Similar findings were obtained in experimental models of carcinogenesis and in macroscopically normal colon of rodents exposed to colon carcinogens [21]. The increased production of PGs in tumors is likely to reflect enhanced COX-2 activity since nearly 85% of adenocarcinomas exhibit between a two- and a fifty-fold increase in COX-2 expression at both mRNA and protein levels compared with matched, macroscopically normal, colonic mucosa from the same patient [22,23]. Increased COX-2 expression has also been observed in experimental models of colon cancer, namely in azoxymethane-treated rats and *Min* mice with multiple intestinal neoplasia [24,25]. *In vitro* studies have revealed that cells over-expressing COX-2 undergo phenotypic changes such as exhibition of an exacerbated adhesion to extra cellular matrix proteins and resistance to apoptosis, that could enhance their tumorigenic

potential [26]. In addition, COX-2-overexpressing cells produce significant amounts of vascular endothelial growth factor (VEGF), a key pro-angiogenic factor that stimulates endothelial cell migration, proliferation of cancer cells and angiogenesis [27]. Several mechanisms may concur to enhance COX-2 gene expression in cancer. In particular, mutations of APC and *ras*; activation of EGF receptor and IGF-I receptor pathways and the heregulin/HER-2 receptor pathway and direct COX-2 induction by the Epstein-Barr virus oncoprotein and latent membrane protein 1 [28,29]. For instance, Oshima *et al* assessed the development of intestinal adenomas in APC^{A716}-knockout mice and found that the number and size of polyps were dramatically reduced (six- to eight-fold) in homozygous COX-2 null mice compared with COX-2 wild-type mice [30].

A number of epidemiological studies have clearly established a strong association between the regular long-term consumption of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), particularly aspirin, and a reduced incidence of colon cancer [31]. Aspirin and sulindac have also been shown to reduce the number and size of adenomatous colonic polyps in patients with familial adenomatous polyposis [32]. Experimental studies have also demonstrated that aspirin, as well as other traditional NSAIDs such as piroxicam, indomethacin, sulindac, ibuprofen and ketoprofen, inhibit chemically-induced colon cancer in rats and mice [reviewed in reference 31]. Given the participation of COX-2 in cell growth, angiogenesis and cancer progression, the close relationship among tumor development, COX-2 induction and increased PG levels unequivocally pointed to COX-2 inhibition as the mechanism of action underlying the chemopreventive effects of NSAIDs. Indeed, the use of agents that selectively inhibit COX-2 in clinical and experimental studies has provided definitive proof that this COX isoform is involved in the cancer preventive actions of NSAIDs. In a randomized clinical trial, celecoxib, a selective COX-2 inhibitor, effectively inhibited the growth of adenomatous polyps and caused regression of existing polyps in patients with hereditary familial adenomatous polyposis [33]. Studies in animal models have also demonstrated that pharmacological inhibition of COX-2 consistently prevents chemically-induced carcinogenesis and intestinal polyp formation [34]. Interestingly, animal studies have shown that celecoxib is able to potentiate the antitumoral activity of conventional chemotherapy and radiation [35,36], an effect that could be related to the recently uncovered COX-2 capability of blocking p53- or genotoxic stress-induced apoptosis [37]. In addition, selective COX-2 inhibitors block *in vitro* cell growth and angiogenesis, thus highlighting the role of COX-2 in cancer progression [38,39]. However, it is intriguing that selective COX-2 inhibition also produces significant anti-proliferative effects in colon cancer cells that do not express COX-2 [40]. This finding together with the observation that sulindac sulfone, a sulindac metabolite devoid of COX inhibitory activity, is able to reduce colon cancer cell growth [41], suggesting that COX-2 and PG-independent mechanisms may also be involved in the anti-neoplastic effects of NSAIDs and selective COX-2 inhibitors.

The discovery of COX-2 has represented a great advance in our understanding of the involvement of the COX

pathway in cancer biology. Following the approval and marketing of the first two selective COX-2 inhibitors, celecoxib (*Celebrex*) and rofecoxib (*Vioxx*), in 1999, these drugs became hugely popular and one of the world's best selling drug class. Unfortunately, *Vioxx*, was withdrawn from the market in 2004 based on the findings from a prospective, randomized, placebo-controlled clinical trial, the APPROVe (Adenomatous Polyp Prevention on *Vioxx*) trial, which demonstrated an increased relative risk for confirmed cardiovascular events, such as heart attack and stroke, in patients taking *Vioxx* compared to those taking placebo [42].

THE LIPOXYGENASE PATHWAY

The lipoxygenase (LO) pathway comprises a family of non-heme iron-containing dioxygenases that catalyze the stereospecific oxygenation of the 5-, 12-, or 15-carbon atoms of arachidonic acid [43-45]. In humans, there are three major LOs, designated 5-LO, 12-LO and 15-LO. 5-LO converts arachidonic acid into 5(*S*)-HETE and leukotrienes (LTs) whereas 12-LO and 15-LO generate the corresponding 12- and 15-HETEs, respectively [43-45]. The human 5-LO gene is mapped to chromosome 10 and appears to be the least related to the 12-LO and 15-LO genes, which are both located on chromosome 17 [46]. Mounting evidence indicate that LO-catalyzed products, especially those derived from 5-LO and 12-LO, are involved in the development and progression of cancer. The significance of the LO pathway in the regulation of cell proliferation and survival and the latest advances in the chemopreventive potential of compounds with proven LO inhibitory activity are discussed in the following pages.

5-LO

Arachidonate 5-LO is the key enzyme in the biosynthesis of LTs. It transforms free arachidonic acid initially to 5-HpETE through the stereospecific abstraction of the pro-*S* hydrogen at carbon-7, followed by insertion of molecular O₂ at carbon-5 [47]. 5-HpETE is either reduced to 5-HETE or subjected to the stereospecific removal of the pro-*R* hydrogen at carbon-10 to generate the highly unstable allylic epoxide LTA₄ (Fig. (2)) [48]. Once formed, LTA₄ is rapidly transformed to either LTB₄ via stereoselective hydration by LTA₄ hydrolase [49] or to LTC₄ through glutathione conjugation catalyzed by LTC₄ synthase (Fig. (2)) [50]. Sequential metabolic reactions catalyzed by γ -glutamyl transferase and a specific membrane-bound dipeptidase, convert LTC₄ into LTD₄ and LTE₄, respectively. Together LTC₄, D₄ and E₄ are termed cysteinyl-leukotrienes (Cys-LTs) and in the past were referred to as the slow-reacting substances of anaphylaxis. LTA₄ can also be further metabolized to the lipoxin family of lipid mediators (see below).

The arachidonate 5-LO is a 674-amino acid protein with an apparent molecular weight between 72 and 80 kDa [reviewed in reference 51]. The 5-LO gene is highly conserved across species [52]. It consists of 14 exons and 13 introns and contains a promoter region that encompasses consensus regions for transcription regulators of the Egr, Sp1, NF- κ B, GATA, myb and AP families [53]. Upon cellular activation, cytosolic or nuclear 5-LO translocates to

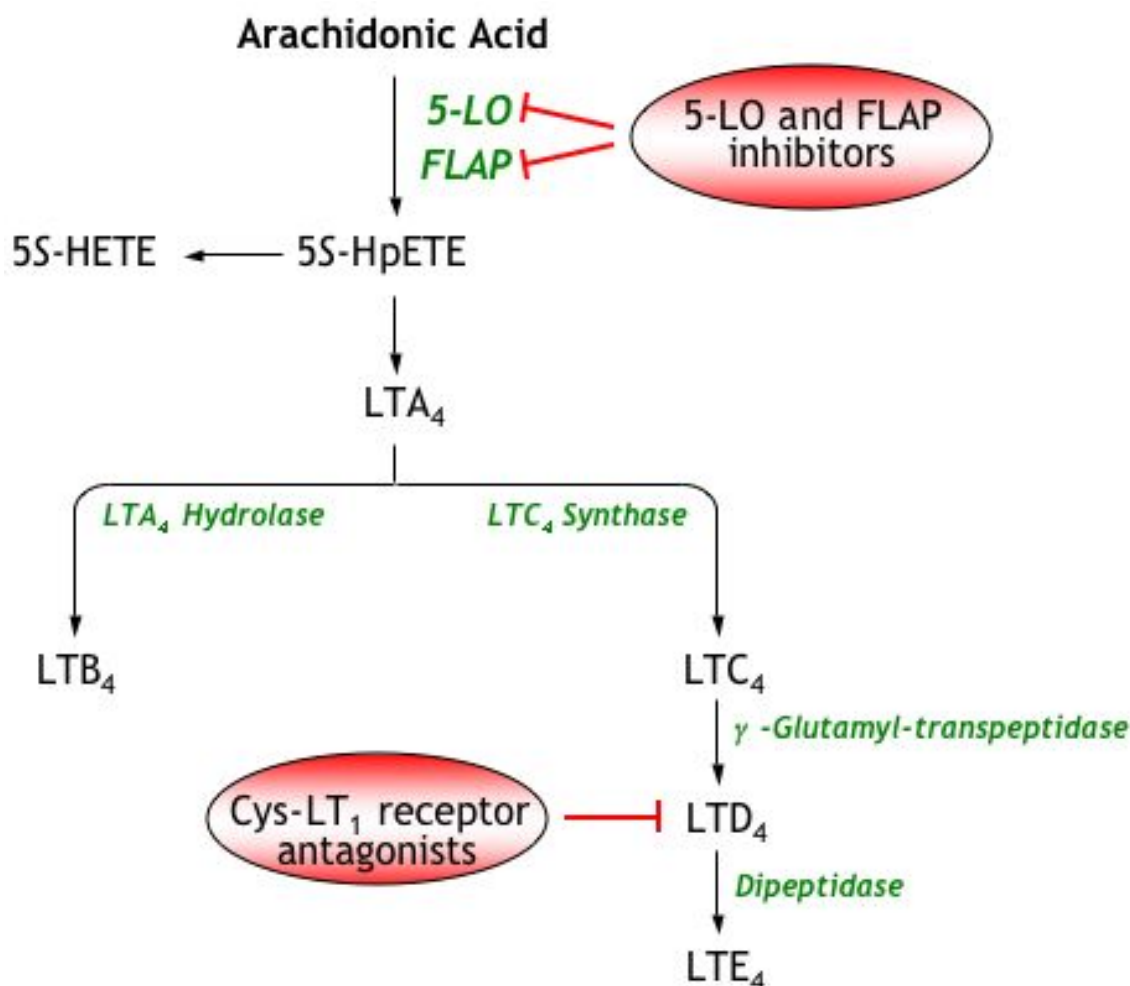


Fig. (2). The 5-lipoxygenase (5-LO) pathway. 5-LO translocates to the nuclear membrane where it binds its accessory protein (five lipoxygenase-activating protein, FLAP) and transforms arachidonic acid to 5S-hydroperoxyeicosatetraenoic acid (5S-HpETE), which is reduced to 5S-HETE or transformed to the highly unstable allylic epoxide leukotriene (LT) A₄. LTA₄ is either hydrolyzed to LTB₄ by a specific LTA₄ hydrolase or converted into LTC₄ by the addition of the peptide glutathione by a specific LTC₄ synthase. LTC₄ can undergo further metabolism through a series of peptidic cleavage reactions to yield LTD₄ and LTE₄. The clinically relevant LT-modifying drugs include 5-LO and FLAP inhibitors as well as Cys-LT₁ receptor antagonists.

the nuclear envelope where it interacts with phospholipase A₂ making free arachidonic acid available to 5-LO [54]. 5-LO also interacts in the nuclear envelope with 5-LO activating protein (FLAP), a 18 kDa resident integral protein which functions as an arachidonic acid transfer protein facilitating the binding of arachidonic acid to 5-LO [54,55]. Both 5-LO translocation and FLAP are crucial for the biosynthesis of 5-LO-derived products [54,55].

Once formed, LTs exert their biological effects *via* activation of G-protein coupled receptors (GPCRs). To date, two LTB₄ and two Cys-LT receptors have been cloned [56-59]. The B-LT₁ receptor and the recently characterized B-LT₂ receptors bind LTB₄ with high and low affinities, respectively. The B-LT₁ receptor is mainly located on leukocytes and its activation elicits a remarkable chemotactic response, whereas the B-LT₂ receptor displays a widespread tissue distribution pattern and its function is currently unknown [56,57]. The two types of Cys-LT receptors, Cys-LT₁ and Cys-LT₂, bind LTC₄ and LTD₄. Cys-LT₁ is found in

airway smooth muscle cells and vascular endothelial cells and its activation promotes vasoconstriction and cell adherence [58]. Cys-LT₂ is distributed within pulmonary veins, the spleen, Purkinje fibers of the heart and the adrenal gland and its function remains unknown [59]. A putative GPCR coupled to a pertussis toxin-sensitive G protein that recognizes 5-oxo-EETE, an oxidation product of 5(S)-HETE, has also been identified [60].

5-LO AND CANCER

Accumulating evidence indicate that 5-LO products promote cancer cell proliferation and survival. Expression of 5-LO has been detected in a number of cancer cells, including colon, lung, breast, prostate, pancreas, bone, brain and mesothelial cells [61-69]. More important, 5-LO mRNA and/or protein are consistently overexpressed in human lung, prostate, pancreatic and colon cancers and in human gliomas and meningiomas [63,65,66,68,69]. The receptors for specific 5-LO products are also present in tumors. Cys-LT₁

is, in fact, highly up-regulated in colorectal adenocarcinomas where it negatively correlates with patient survival [69]. 5-LO also reduces cancer cell chemoresistance and appears to interfere with the mechanisms of tumor suppression and to condition tumor response to genotoxic therapeutic agents. The use of 5-LO inhibitors in cell cultures of neurons, mast cells, Kupffer cells, mesothelial and endothelial cells, and in lung, prostate, breast and pancreas cancer cell lines have demonstrated that these agents stop growth-related signals and induce programmed cell death [62,63,67,70-78]. Given that 5-LO converts arachidonic acid into 5-HETE, LTB₄ and Cys-LTs, any of these eicosanoids could account for the anti-proliferative effects associated with 5-LO inhibition. Although LTB₄ and Cys-LTs have been shown to induce cell growth in lymphocytes, Kupffer cells, fibroblasts, epidermal keratinocytes and epithelial, endothelial and smooth muscle cells [79-84], 5(S)-HETE is the 5-LO product with the highest mitogenic properties. Indeed, increased levels of 5(S)-HETE have been reported in malignant tissue compared with normal tissue [68]. Moreover, after inhibiting the 5-LO pathway, exogenous addition of 5(S)-HETE stimulates breast and prostate cancer cell growth [62,85] and rescues prostate cell cultures from apoptosis [74,86].

The mechanisms by which the 5-LO pathway regulates cancer cell survival are elusive. Several molecular events including up-regulation of PPAR α and γ [62], direct interaction of 5-LO with proteins involved in cell signaling and cytoskeletal organization [87,88] and increased levels of intracellular free arachidonate [89], have been suggested. VEGF appears to represent a target for 5-LO activity since the 5-LO metabolites 5(S)-HETE and LTA₄ induce VEGF transcription in human malignant mesothelial cells [67]. In addition to being a potent pro-angiogenic factor, VEGF can function as an autocrine growth regulator, thus 5-LO may promote cancer development and/or progression by acting on two different mechanisms, both crucial for carcinogenesis. It has been argued that the apoptotic actions of 5-LO inhibitors may be the consequence of the non-specific pharmacological effects of this class of drugs. However, similar apoptotic effects are obtained with inhibition of 5-LO at the gene level with specific antisense oligonucleotides [67,90]. In any event, the role of 5-LO in cell growth and survival appears to be a rather complex process since FLAP inhibitors are able to induce apoptosis in cells devoid of 5-LO activity [91].

12-LO

Arachidonate 12-LO exists in several isoforms, all of which contain 662 amino acid residues with an apparent molecular weight of about 75 kDa [92,93]. There are three isoforms of 12S-LO with distinct genomic sequence, gene structure, immunogenicity and substrate specificity, named after the cells in which they were first identified. These include *i*) the platelet-type, now designated 12(S)-LO, which metabolizes arachidonic acid into 12(S)-HETE [94]; *ii*) the leukocyte-type, which converts arachidonic acid or linoleic acid into 12(S)-HETE and also small quantities of 15(S)-HETE [95], and *iii*) the epithelial- or epidermis-type, that catalyzes the synthesis of both 12(S)- and 15(S)-HETE from arachidonic acid [96].

A comprehensive evaluation of the role of 12-LO in cancer has been performed by Honn and co-workers [97].

These authors have reported that 12-LO expression is a common finding in a variety of tumor cells including erythroleukemia, colon and epidermoid carcinoma, glioma and breast cancer cells [97]. Expression of 12-LO is markedly up-regulated in cancerous prostate and breast tissues as compared to matched normal tissues [97-99]. Recent studies have unveiled the production of large quantities of 12-HETE by papillomas and carcinomas in a mouse skin tumor model [100]. The 12-LO metabolite 12(S)-HETE appears to play a critical role in prostate tumor metastasis and invasion [98]. Indeed, the ability of tumor cells to generate 12(S)-HETE correlates well with their metastatic potential [101]. Moreover, 12(S)-HETE significantly increases cellular motility and the ability to invade the basement membrane of prostate adenocarcinoma cells [102] and to mediate the proliferative effects of estrogen and linoleic acid in a human breast cancer cell line [103]. Collectively, these data strongly suggest that 12-LO-derived eicosanoids stimulate proliferation and angiogenesis and that 12-LO may have similar pro-neoplastic actions to 5-LO and COX-2.

15-LO

15-LO exists in two isoforms: 15-LOX-1 and 15-LOX-2 [104,105]. 15-LOX-1 prefers linoleic acid as the substrate to form 13(S)-hydroxy octadecadienoic acid (13-HODE) whereas 15-LOX-2 preferentially transforms arachidonic acid into 15(S)-HETE [105]. Contrary to what occurs with 5-LO and 12-LO, little is known about the role of 15-LO in cancer. The expression of 15-LOX-1 has been found to be highly up-regulated in human prostate cancer tissue where its expression positively correlates with the degree of malignancy [106]. On the other hand, the expression of 15-LOX-2 is lost in prostate carcinoma [107]. These findings have raised the notion that 15-LO isoforms may have opposite effects on cancer cells, with isoform 1 being stimulatory and isoform 2 inhibitory of cancer cell proliferation [108]. In fact, 15(S)-HETE, which is mainly derived from 15-LOX-2, displays potent inhibitory actions on the proliferation of carcinoma cells [109].

NEW DIRECTIONS

The eicosanoid cascade offers an unprecedented number of therapeutic opportunities, especially in the areas of inflammation and cancer. Among the different targets of potential pharmacological intervention, in the current review we place emphasis on three new approaches: the development of dual COX-2/5-LO inhibitors, the biological effects of endogenous bioactive products derived from the interaction of individual LOs (i.e. lipoxins) and the identification of cyclopentenone-PGs with potent biological actions (Fig. (3)).

Dual COX-2/5-LO inhibitors

COX-2 and 5-LO display similar expression patterns and converging functions and appear to represent an integrated system that regulates the proliferative and pro-angiogenic potential of cancer cells. In fact, COX-2 and 5-LO are clearly up-regulated in a large number of cancer cells and human tumors [44,61]. Moreover, both COX-2 and 5-LO are pro-angiogenic [27,67] and their inhibition is associated with a decline in cell-cycle progression and the induction of

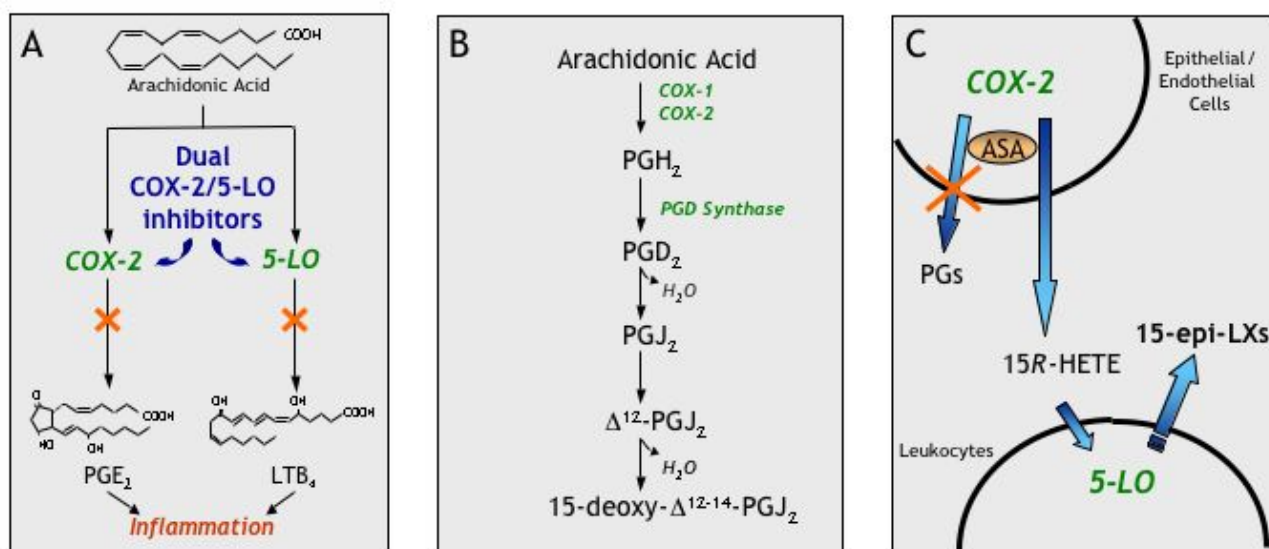


Fig. (3). Emerging pharmacological targets. (A) Inhibitors with dual actions on cyclooxygenase-2 (COX-2)/5-lipoxygenase (5-LO) are currently being tested in human studies. (B) PGD₂, which is generated by the sequential actions of COX-1/COX-2 and PGD synthase, undergoes nonenzymatic dehydration, losing water to form the cyclopentenone PGJ₂ and its derivatives (Δ¹²-PGJ₂ and 15-deoxy-Δ¹²⁻¹⁴-PGJ₂). (C) The endogenous formation of potent anti-inflammatory and anti-proliferative eicosanoids has been recently described. The biosynthesis of these lipid mediators is triggered by aspirin (ASA), which acetylates the active site of COX-2 in endothelial and epithelial cells, resulting in the inhibition of PG formation and the conversion of arachidonic acid into 15*R*-hydroxyeicosatetraenoic acid (15*R*-HETE). 15*R*-HETE is subsequently transformed by leukocyte 5-LO to a new series of lipoxin (LX) epimers, termed 15-epi-LXs.

apoptosis [27,38,39,62,63,67,74,76]. In addition, both COX-2 and 5-LO enhance chemoresistance of cancer cells [37,78].

While in theory it is quite easy to design a drug acting on one enzyme, it is more daunting to design a drug that selectively inhibits two different enzymes, specially if these are not structurally related. One of the first compounds with dual COX/5-LO inhibitory activity was tepoxalin, a pyrazole containing hydroxamic acid able to chelate the non-heme iron atom of 5-LO [110]. Tepoxalin underwent clinical evaluation for psoriasis and rheumatoid arthritis but unfortunately was discontinued in Phase II [111]. A COX/5-LO inhibitor currently evaluated in clinical trials for arthritis is S-2474 which displays excellent anti-inflammatory and analgesic activities associated with remarkable gastric safety [112,113]. RWJ-63556, a compound structurally related to the selective COX-2 inhibitor nimesulide, is another potent orally active COX-2/5-LO inhibitor with remarkable anti-inflammatory activity in experimental carrageenan-induced inflammation [114]. An interesting activity profile has also been noted for ER-34122 which suppresses progression of PMN infiltration, subsynovial soft tissue edema and multiplication of synovial lining cells in the early stages of arthritis in a mouse model of systemic lupus erythematosus [115,116].

Licofelone, previously known as ML-3000, is a pyrrolizine derivative and an arachidonic acid substrate analog that inhibits both COX and 5-LO. Unlike most of the above described dual inhibitors, licofelone is neither an antioxidant nor an iron chelator [117,118]. Licofelone has been shown to inhibit COX in bovine and human platelets and 5-LO in

bovine and human granulocytes [118]. Moreover, licofelone exhibits not only anti-inflammatory but also potent analgesic, anti-pyretic and anti-thrombotic activities with little or no gastrointestinal damage in experimental animals [117-119]. In addition, in guinea pigs challenged with arachidonic acid or antigen and in sheep challenged with antigen, licofelone displays potent anti-asthmatic activity [120]. Although phase III trials have been successfully completed in patients with osteoarthritis, no dates for regulatory submission have yet been given. In these studies, licofelone has shown an excellent gastrointestinal profile, much better than conventional NSAIDs and equivalent to selective COX-2 inhibitors [121,122]. Furthermore, in healthy subjects, licofelone is well tolerated with no hepatotoxicity and has a good pattern of tissue distribution, with the highest levels being reached in the lung, liver, kidneys, heart and large and small intestine [119,121,122].

Considering the pro-inflammatory properties of COX-2 and 5-LO-derived eicosanoids, dual COX-2/5-LO inhibitors should, in theory, have a superior profile than individual selective COX-2 and 5-LO inhibitors in the treatment of inflammatory disorders including arthritis, osteoarthritis, asthma and inflammatory bowel disease. Although no human data are available analyzing the superiority of the anti-inflammatory efficacy of inhibiting two pathways versus inhibition of a single pathway, experimental and cellular studies indicate that dual inhibitors may have some disease modifying activity and may stop disease progression by reducing the expression of matrix metalloproteinase-13 and IL-1β, as well as chondrocyte death [123,124].

LO-LO Interaction Products: Lipoxins

Lipoxins (LXs) are conjugated trihydroxytetraene-containing eicosanoids generated by transcellular biosynthesis during cell-cell interactions [125]. Transcellular metabolism is a common finding in eicosanoid biosynthesis and involves the processing of a metabolic intermediate generated by one cell (donor cell) by a vicinal cell (acceptor cell) for the production of an active eicosanoid which neither cell can generate alone [126]. In mammals, there are two different routes of LX biosynthesis occurring during LO-LO interactions. The first route of LX biosynthesis involves the interaction of platelets with leukocytes within the vascular lumen. In this setting, LX biosynthesis is initiated by the release of the epoxide intermediate LTA₄ formed by 5-LO in activated leukocytes, which is then converted by platelet 12-LO to LXA₄ and LXB₄ [127,128]. The second route of transcellular LX biosynthesis involves the sequential interaction of a 15-LO with a 5-LO. This LX formation route takes place mainly in tissues in which endothelial and epithelial cells expressing 15-LO can interact with 5-LO-containing leukocytes. 15-LO-initiated LX production is clearly demonstrated in airway epithelial cells, monocytes and eosinophils following the activation of 15-LO [reviewed in reference 125]. Once activated, these cells generate and release 15(*S*)-HETE, which is rapidly taken up and converted by neutrophils to LXs *via* the action of 5-LO [129]. Concomitant with the biosynthesis of LXs by the 15-LO-initiated route, LT biosynthesis is blocked at the 5-LO level, resulting in an inverse relationship between LT and LX formation [125,130]. Interestingly, the formation of these anti-inflammatory compounds appears to be temporarily and spatially distinct from the formation of PGs [131,132]. Formation of LXs from endogenous arachidonic acid through the sequential actions of 15-LO and 5-LO can also occur in a single cell type, particularly in granulocytes and macrophages primed with cytokines. Formation of LXs from a single cell type has been demonstrated in leukocytes isolated from asthmatic patients and patients with chronic liver disease [133,134].

15-*epi*-Lipoxin Biosynthesis

A new pathway of 15-*epi*-lipoxins (15-*epi*-LXs) biosynthesis that does not involve LO-LO interactions has also been uncovered [135]. This *epi*-LX biosynthetic route is initiated by aspirin, which acetylates serine-516 of COX-2 and the resulting acetylated-COX-2 (Ac-COX-2) remains catalytically active, with AA able to bind to Ac-COX-2's arginine-120. In this process substrate's conformation is changed, PG biosynthesis is inhibited and Ac-COX-2 transforms arachidonic acid to 15(*R*)-HETE (Fig. (3)). 15(*R*)-HETE is subsequently released and transformed by activated leukocytes possessing 5-LO to a new series of carbon-15 epimers of LXs in which 15-hydroxyl group is in the *R* configuration (15-*epi*-LXs) [125,135]. The formation of these lipid mediators is specific for aspirin treatment and the term aspirin-triggered lipoxins, abbreviated as ATL, has been coined for these compounds [125].

Biological Actions of LXs and 15-*epi*-LXs

LXs and ATL display a unique spectrum of biological activities. Unlike LTs, which are pro-inflammatory comp-

ounds that facilitate neutrophil adhesion to the vascular wall and recruitment at the site of inflammation and leukocyte respiratory burst and degranulation [43-45], LXs and ATL display potent anti-inflammatory actions. These eicosanoids appear to work as "stop-signals" for inflammation and inhibit chemotaxis, selectin- and integrin-mediated adhesion to and transmigration across endothelial monolayers, superoxide generation and cytokine release [136-141]. *In vivo*, LX stable analogs inhibit LTB₄-induced leukocyte rolling and adherence and neutrophil margination and extravasation [142]. LX analogs inhibit TNF α -stimulated leukocyte trafficking and chemokine secretion in murine air pouches and when applied topically to mouse ears dramatically inhibit leukocyte infiltration and vascular permeability [143,144]. ATL analogs protect mice from renal ischemia-reperfusion injury and glomerulonephritis [145]. In an animal model of periodontal disease, LX and ATL analogs attenuate gingivitis and leukocyte recruitment [146,147]. Intravenous delivery of LXs and ATL inhibit acute dermal inflammation and neutrophil infiltration of skin microabscesses and lungs in LTB₄ receptor transgenic mice [148]. In a murine model of asthma, LX and ATL stable analogs attenuate airway hyperreactivity and inflammation and accelerate resolution of pulmonary edema [149]. Administration of a metabolically stable LXA₄ analog in a mouse model of chronic airway inflammation and infection associated with cystic fibrosis suppresses neutrophilic inflammation, decreases pulmonary bacterial burden and attenuates disease severity [150]. Finally, ZK-192, a β -oxidation-resistant LXA₄ analog with enhanced chemical stability and oral pharmacokinetics potently attenuates hapten-induced colitis in rats [151].

In addition to the anti-inflammatory properties, LXs and ATL display regulatory actions on cell proliferation and angiogenesis [130,152,153]. The antiproliferative actions of native LXs and ATL were first documented in a human lung adenocarcinoma cell line [130]. Subsequently, LXA₄ was shown to antagonize the mitogenic effects of LTD₄ in human renal mesangial cells [154-156]. The mechanisms whereby LXA₄ blocks mesangial cell proliferation appear to involve the modulation of receptor tyrosine kinase activity and inhibition of growth factor activation of Akt/protein kinase B [154-156]. Additional findings have been reported by Fierro *et al* in human endothelial cells, in which a stable ATL analog (15-*epi*-16-(para-fluoro)-phenoxy-LXA₄) was shown to inhibit VEGF-induced cell proliferation and migration [152]. This ATL analog blocks VEGF-induced endothelial cell migration by mechanisms involving actin polymerization and focal adhesion assembly due to inhibition of both stress-activated protein kinase and focal adhesion kinase phosphorylation [157]. More importantly, these authors have also demonstrated that 15-*epi*-16-(para-fluoro)-phenoxy-LXA₄ is able to reduce the formation of blood vessels *in vivo* following the administration of VEGF in a murine model of angiogenesis [152]. LXA₄ has also been shown to induce apoptosis in rat renal interstitial fibroblasts and the proposed signaling mechanisms for this effect appear to involve modulation of Akt/protein kinase B and subsequent activation of the caspase cascade [158]. On the other hand, LXs and ATL are potent regulators of the cytokine-chemokine axis and inhibit the expression and release of the pro-

angiogenic cytokine IL-8 while stimulating the production of IL-4, a cytokine with anti-angiogenic properties [139,141, 159]. Moreover, LXs reduce the synthesis of metalloproteinases and increase tissue inhibitor metalloproteinase-1 levels, both of which are implicated in the regulation of the proteolytic digestion of the basement membrane, a key step in the angiogenic process [160].

It is important to note that in addition to its well known use for relieving inflammation and mild to moderate pain and fever and for the prevention of myocardial infarction, aspirin has protective actions in several forms of human cancer, including colon, lung and breast cancer [31]. The precise mechanisms underlying the potential anti-tumor effects of aspirin are not completely understood and, at present, it is debated whether all the properties of this NSAID are attributable to inhibition of COX and PG biosynthesis. Therefore, the demonstration that, in addition to blocking PG biosynthesis, aspirin is able to trigger the biosynthesis of ATL, supports a role for these eicosanoids as a potential mechanism that may contribute to the recognized anti-neoplastic properties of aspirin.

Cyclopentenone PGs

Cyclopentenone PGs (cyPGs) are products of the nonenzymatic dehydration of PGs. CyPGs are structurally defined by the presence of a highly reactive α,β -unsaturated carbonyl moiety in the cyclopentenone ring [161]. From a biological point of view, the most relevant cyPGs are those derived from the dehydration of PGD₂, including the PGs of the J₂ series: PGJ₂, Δ^1 -PGJ₂ and 15d-PGJ₂ (Fig. (3)). Unlike other PGs, to date, no specific transmembrane receptor has been identified for these PGs. Instead, 15d-PGJ₂ appears to exert its effects through binding and activation of the nuclear receptor superfamily of ligand-activated transcription factors. Indeed, 15d-PGJ₂ is a natural ligand of PPAR γ [162]. Other actions independent of PPAR γ have also been reported for cyPGs, including down-regulation of NF- κ B transcriptional activity [163], inhibition of cytokine production by monocytes [164] and direct inhibition of key enzymes of the eicosanoid cascade, namely cytosolic phospholipase A₂, COX-2 and mPGES-1 [165,166].

CyPGs have a broad spectrum of biological effects including powerful immunomodulatory and anti-inflammatory properties, suppression of viral replication and stimulation of osteogenesis [161,167]. In addition, cyPGs display unique characteristics associated with cell proliferation and apoptosis. Unlike PGs, which stimulate tumor growth, cyPGs exhibit anti-proliferative effects on cancer cells and attenuate the tumorigenic potential of cancer cells in nude mice [168]. The anti-proliferative effects of cyPGs are associated with their potential to regulate the expression of a wide array of genes involved in the control of cell cycle and cell survival/death. Thus, the anti-proliferative effects of 15d-PGJ₂ appear to be mediated by the modulation of H-Ras, mitogen-activated protein kinase (MAPK) and Akt [169]. Moreover, *in vitro* studies have shown the ability of 15d-PGJ₂ to promote apoptosis in endothelial cells, myofibroblasts, leukocytes, neurons and synoviocytes [170-178]. The apoptotic pathways induced by 15d-PGJ₂ depend upon the cell type. In granulocytes, PGJ₂ and 15d-PGJ₂ induce caspase-dependent apoptosis via inhibition of I κ B α

degradation [174] whereas in basophilic leukemia cells and myofibroblasts, PGJ₂-induced apoptosis is primarily mediated by activation of caspase-3 and -9 [175,176]. In neuroblastoma cells, 15d-PGJ₂ induces the accumulation of p53 and the activation of the caspase cascade mediated by Fas and the Fas ligand [177]. In macrophages, 15d-PGJ₂ may also exert its apoptotic effects by mechanisms involving activation of Protein Kinase C ζ -induced imbalance between MAPKs and NF- κ B [178]. It should be mentioned that although anti-proliferative and pro-apoptotic actions for 15d-PGJ₂ have most frequently been described, several reports have demonstrated the opposite and that this CyPG induces cell proliferation and potentiates tumor growth [179,180].

CONCLUDING REMARKS

In summary, in the last few years, COX-2 and 5-LO have emerged as key regulators of cell proliferation and neo-angiogenesis. Consequently, strategies that specifically target these eicosanoid-generating pathways are currently being developed as potential anti-cancer drug treatments. In addition, therapeutic approaches based on the use of dual COX-2/5-LO inhibitors or strategies aimed to enhance the formation of endogenous compounds such as LXs and cyPGs are worthy of consideration.

ACKNOWLEDGMENTS

Our laboratory is supported by grants from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF 03/0586 and SAF 06/03191) and Instituto de Salud Carlos III (C03/02). We apologize to colleagues whose work may not have been cited due to space limitations.

ABBREVIATIONS

COX	=	Cyclooxygenase
FLAP	=	Five-lipoxygenase activating protein
HETEs	=	Hydroxyeicosatetraenoic acids
LXs	=	Lipoxins
ATL	=	Aspirin-triggered LXs
LTs	=	Leukotrienes
LO	=	Lipoxygenase
NSAIDs	=	Non-steroidal anti-inflammatory drugs
PGs	=	Prostaglandins
CyPGs	=	Cyclopentenone PGs
TX	=	Thromboxane
VEGF	=	Vascular endothelial growth factor

REFERENCES

- [1] Ohki, S.; Ogino, N.; Yamamoto, S.; Hayaishi, O. Prostaglandin hydroperoxidase, an integral part of prostaglandin endoperoxide synthetase from bovine vesicular gland microsomes. *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 829-836.
- [2] Smith, W. L.; Song, I. The enzymology of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **2002**, *68-69*, 115-118.
- [3] Dudzinski, D. M.; Serhan, C. N. Pharmacology of eicosanoids. In *Principles of pharmacology: The pathophysiologic basis of drug therapy*; Golan, D. E.; Tashjian, A. H.; Armstrong, E. J.; Galanter, J. M.; Armstrong, A. W.; Arnaout, R. A.; Rose, H. S., Eds.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, 2004; pp 627-646.

- [4] Jakobsson, P. J.; Thoren, S.; Morgenstern, R.; Samuelsson, B. Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 7220-7225.
- [5] Tanioka, T.; Nakatani, Y.; Semmyo, N.; Murakami, M.; Kudo, I. Molecular identification of cytosolic prostaglandin E₂ synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E₂ biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 32775-32782.
- [6] Murakami, M.; Kudo, I. Recent advances in molecular biology and physiology of the prostaglandin E₂-biosynthetic pathway. *Prog. Lipid Res.* **2004**, *43*, 3-35.
- [7] Tanikawa, N.; Ohmiya, Y.; Ohkubo, H.; Hashimoto, K.; Kangawa, K.; Kojima, M.; Ito, S.; Watanabe, K. Identification and characterization of a novel type of membrane-associated prostaglandin E synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *291*, 884-889.
- [8] Mancini, J. A.; Blood, K.; Guay, J.; Gordon, R.; Claveau, D.; Chan, C. C.; Riendeau, D. Cloning, expression, and up-regulation of inducible rat prostaglandin E synthase during lipopolysaccharide-induced pyresis and adjuvant-induced arthritis. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 4469-4475.
- [9] Breyer, R. M.; Bagdassarian, C. K.; Myers, S. A.; Breyer, M. D. Prostanoid receptors: subtypes and signaling. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2001**, *41*, 661-690.
- [10] Evans, R. M.; Barish, G. D.; Wang, Y. X. PPARs and the complex journey to obesity. *Nat. Med.* **2004**, *10*, 355-361.
- [11] Kujubu, D. A.; Fletcher, B. S.; Varnum, B. C.; Lim, R. W.; Herschman, H. R. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 12866-12872.
- [12] Xie, W.; Chipman, J. G.; Robertson, D. L.; Erikson, R. L.; Simmons, D. L. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 2692-2696.
- [13] O'Banion, M. K.; Sadowski, H. B.; Winn, V.; Young, D. A. A serum- and glucocorticoid-regulated 4-kilobase mRNA encodes a cyclooxygenase-related protein. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 23261-23267.
- [14] Jones, D. A.; Carlton, D. P.; McIntyre, T. M.; Zimmerman, G. A.; Prescott, S. M. Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 9049-9054.
- [15] Tanabe, T.; Tohnai, N. Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **2002**, *68-69*, 95-114.
- [16] Hla, T.; Neilson, K. Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 7384-7388.
- [17] Clària, J. Cyclooxygenase-2 biology. *Curr. Pharm. Des.* **2003**, *9*, 2177-2190.
- [18] Herschman, H. R. Prostaglandin synthase 2. *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1299*, 125-140.
- [19] Morita, I. Distinct functions of COX-1 and COX-2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **2002**, *68-69*, 165-175.
- [20] Rigas, B.; Goldman, I. S.; Levine, L. Altered eicosanoid levels in human colon cancer. *J. Lab. Clin. Med.* **1993**, *122*, 518-523.
- [21] Rao, C. V.; Simi, B.; Wynn, T. T.; Garr, K.; Reddy, B. S. Modulating effect of amount and types of dietary fat on colonic mucosal phospholipase A₂, phosphatidylinositol-specific phospholipase C activities, and cyclooxygenase metabolite formation during different stages of colon tumor promotion in male F344 rats. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 532-537.
- [22] Eberhart, C. E.; Coffey, R. J.; Radhika, A.; Giardiello, F. M.; Ferrenbach, S.; DuBois, R. N. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* **1994**, *107*, 1183-1188.
- [23] Kutcher, W.; Jones, D. A.; Matsunami, N.; Groden, J.; McIntyre, T. M.; Zimmerman, G. A.; White, R. L.; Prescott, S. M. Prostaglandin H synthase 2 is expressed abnormally in human colon cancer: evidence for a transcriptional effect. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 4816-4820.
- [24] DuBois, R. N.; Radhika, A.; Reddy, B. S.; Entingh, A. J. Increased cyclooxygenase-2 levels in carcinogen-induced rat colonic tumors. *Gastroenterology* **1996**, *110*, 1259-1262.
- [25] Williams, C. S.; Luongo, C.; Radhika, A.; Zhang, T.; Lamps, L. W.; Nanney, L. B.; Beauchamp, R. D.; DuBois, R. N. Elevated cyclooxygenase-2 levels in Min mouse adenomas. *Gastroenterology* **1996**, *111*, 1134-1140.
- [26] Tsujii, M.; DuBois, R. N. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell* **1995**, *83*, 493-501.
- [27] Tsujii, M.; Kawano, S.; Tsuji, S.; Sawaoka, H.; Hori, M.; DuBois, R. N. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* **1998**, *93*, 705-716.
- [28] Vadlamudi, R.; Mandal, M.; Adam, L.; Steinbach, G.; Mendelsohn, J.; Kumar, R. Regulation of cyclooxygenase-2 pathway by HER2 receptor. *Oncogene* **1999**, *18*, 305-314.
- [29] Murono, S.; Inoue, H.; Tanabe, T.; Joab, I.; Yoshizaki, T.; Furukawa, M.; Pagano, J. S. Induction of cyclooxygenase-2 by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is involved in vascular endothelial growth factor production in nasopharyngeal carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 6905-6910.
- [30] Oshima, M.; Dinchuk, J. E.; Kargman, S. L.; Oshima, H.; Hancock, B.; Kwong, E.; Trzaskos, J. M.; Evans, J. F.; Taketo, M. M. Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell* **1996**, *87*, 803-809.
- [31] Thun, M. J.; Henley, S. J.; Patrono, C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *J. Natl. Cancer Inst.* **2002**, *94*, 252-266.
- [32] Rigau, J.; Piqué, J. M.; Rubio, E.; Planas, R.; Tarrech, J. M.; Bordas, J. M. Effects of long-term sulindac therapy on colonic polyposis. *Ann. Intern. Med.* **1991**, *115*, 952-954.
- [33] Steinbach, G.; Lynch, P. M.; Phillips, R. K.; Wallace, M. H.; Hawk, E.; Gordon, G. B.; Wakabayashi, N.; Saunders, B.; Shen, Y.; Fujimura, T.; Su, L. K.; Levin, B. The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N. Engl. J. Med.* **2000**, *342*, 1946-1952.
- [34] Oshima, M.; Murai, N.; Kargman, S.; Arguello, M.; Luk, P.; Kwong, E.; Taketo, M. M.; Evans, J. F. Chemoprevention of intestinal polyposis in the Apcdelta716 mouse by rofecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 1733-1740.
- [35] Milas, L.; Kishi, K.; Hunter, N.; Mason, K.; Masferrer, J. L.; Tofilon, P. J. Enhancement of tumor response to gamma-radiation by an inhibitor of cyclooxygenase-2 enzyme. *J. Natl. Cancer Inst.* **1999**, *91*, 1501-1504.
- [36] Trifan, O. C.; Durham, W. F.; Salazar, V. S.; Horton, J.; Levine, B. D.; Zweifel, B. S.; Davis, T. W.; Masferrer, J. L. Cyclooxygenase-2 inhibition with celecoxib enhances antitumor efficacy and reduces diarrhea side effect of CPT-11. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 5778-5784.
- [37] Han, J. A.; Kim, J. I.; Ongusaha, P. P.; Hwang, D. H.; Ballou, L. R.; Mahale, A.; Aaronson, S. A.; Lee, S. W. P53-mediated induction of Cox-2 counteracts p53- or genotoxic stress-induced apoptosis. *EMBO J.* **2002**, *21*, 5635-5644.
- [38] Sheng, H.; Shao, J.; Kirkland, S. C.; Isakson, P.; Coffey, R. J.; Morrow, J.; Beauchamp, R. D.; Dubois, R. N. Inhibition of human colon cancer cell growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2. *J. Clin. Invest.* **1997**, *99*, 2254-2259.
- [39] Kawamori, T.; Rao, C. V.; Seibert, K.; Reddy, B. S. Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 409-412.
- [40] Elder, D. J.; Halton, D. E.; Hague, A.; Paraskeva, C. Induction of apoptotic cell death in human colorectal carcinoma cell lines by a cyclooxygenase-2 (COX-2)-selective nonsteroidal anti-inflammatory drug: independence from COX-2 protein expression. *Clin. Cancer Res.* **1997**, *3*, 1679-1683.
- [41] Piazza, G. A.; Rahm, A. K.; Finn, T. S.; Fryer, B. H.; Li, H.; Stoumen, A. L.; Pamukcu, R.; Ahnen, D. J. Apoptosis primarily accounts for the growth-inhibitory properties of sulindac metabolites and involves a mechanism that is independent of cyclooxygenase inhibition, cell cycle arrest, and p53 induction. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 2452-2459.
- [42] Bresalier, R. S.; Sandler, R. S.; Quan, H.; Bolognese, J. A.; Oxenius, B.; Horgan, K.; Lines, C.; Riddell, R.; Morton, D.; Lanasa, A.; Constan, M. A.; Baron, J. A. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352*, 1092-1102.
- [43] Funk, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* **2001**, *294*, 1871-1875.

- [44] Romano, M.; Clària, J. Cyclooxygenase-2 and 5-Lipoxygenase converging functions on cell proliferation and tumor angiogenesis: Implications for cancer therapy. *FASEB J.* **2003**, *17*, 1986-1995.
- [45] Samuelsson, B.; Dahlen, S. E.; Lindgren, J. A.; Rouzer, C. A.; Serhan, C. N. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science* **1987**, *237*, 1171-1176.
- [46] Funk, C. D.; Funk, L. B.; Fitzgerald, G. A.; Samuelsson, B. Characterization of human 12-lipoxygenase genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 3962-3966.
- [47] Borgeat, P.; Hamberg, M.; Samuelsson, B. Transformation of arachidonic acid and homo-gamma-linolenic acid by rabbit polymorphonuclear leukocytes. Monohydroxy acids from novel lipoxygenases. *J. Biol. Chem.* **1976**, *251*, 7816-7820.
- [48] Rouzer, C. A.; Matsumoto, T.; Samuelsson, B. Single protein from human leukocytes possesses 5-lipoxygenase and leukotriene A₄ synthase activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 857-861.
- [49] Radmark, O.; Shimizu, T.; Jornvall, H.; Samuelsson, B. Leukotriene A₄ hydrolase in human leukocytes. Purification and properties. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 12339-12345.
- [50] Lam, B. K.; Austen, F. K. Leukotriene C₄ synthase. A pivotal enzyme in the biosynthesis of the cysteinyl leukotrienes. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2000**, *161*, S16-19.
- [51] Radmark, O. Arachidonate 5-lipoxygenase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **2002**, *68-69*, 211-234.
- [52] Funk, C. D.; Hoshiko, S.; Matsumoto, T.; Radmark, O.; Samuelsson, B. Characterization of the human 5-lipoxygenase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 2587-2591.
- [53] Hoshiko, S.; Radmark, O.; Samuelsson, B. Characterization of the human 5-lipoxygenase gene promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 9073-9077.
- [54] Pouliot, M.; McDonald, P. P.; Krump, E.; Manzini, J. A.; McColl, S. R.; Weech, P. K.; Borgeat, P. Colocalization of cytosolic phospholipase A₂, 5-lipoxygenase, and 5-lipoxygenase-activating protein at the nuclear membrane of A23187-stimulated human neutrophils. *Eur. J. Biochem.* **1996**, *238*, 250-258.
- [55] Dixon, R. A.; Diehl, R. E.; Opas, E.; Rands, E.; Vickers, P. J.; Evans, J. F.; Gillard, J. W.; Miller, D. K. Requirement of a 5-lipoxygenase-activating protein for leukotriene synthesis. *Nature* **1990**, *343*, 282-284.
- [56] Yokomizo, T.; Izumi, T.; Chang, K.; Takuwa, Y.; Shimizu, T. A G-protein-coupled receptor for leukotriene B₄ that mediates chemotaxis. *Nature* **1997**, *387*, 620-624.
- [57] Yokomizo, T.; Kato, K.; Terawaki, K.; Izumi, T.; Shimizu, T. A second leukotriene B(4) receptor, BLT2. A new therapeutic target in inflammation and immunological disorders. *J. Exp. Med.* **2000**, *192*, 421-432.
- [58] Lynch, K. R.; O'Neill, G. P.; Liu, Q.; Im, D. S.; Sawyer, N.; Metters, K. M.; Coulombe, N.; Abramovitz, M.; Figueroa D. J.; Zeng, Z.; Connolly, B. M.; Bai, C.; Austin, C. P.; Chateaufneuf, A.; Stocco, R.; Greig, G. M.; Kargman, S.; Hooks, S. B.; Hofstead, E.; Williams, D. L. Jr.; Ford-Hutchinson, A. W.; Caskey, C. T.; Evans, J. F. Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor. *Nature* **1999**, *399*, 789-793.
- [59] Heise, C. E.; O'Dowd, B. F.; Figueroa, D. J.; Sawyer, N.; Nguyen, T.; Im, D. S.; Stocco, R.; Bellefeuille, J. N.; Abramovitz, M.; Cheng, R.; Williams, D. L. Jr.; Zeng, Z.; Liu, Q.; Ma, L.; Clements, M. K.; Coulombe, N.; Liu, Y.; Austin, C. P.; George, S. R.; O'Neill, G. P.; Metters, K. M.; Lynch, K. R.; Evans, J. F. Characterization of the human cysteinyl leukotriene 2 receptor. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 30531-30536.
- [60] Powell, W. S.; Rokach, J. Biochemistry, biology and chemistry of the 5-lipoxygenase product 5-oxo-EETE. *Prog. Lipid Res.* **2005**, *44*, 154-183.
- [61] Hong, S. H.; Avis, I.; Vos, M. D.; Martinez, A.; Treston, A. M.; Mulshine, J. L. Relationship of arachidonic acid metabolizing enzyme expression in epithelial cancer cell lines to the growth effect of selective biochemical inhibitors. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 2223-2228.
- [62] Avis, I.; Hong, S. H.; Martinez, A.; Moody, T.; Choi, Y. H.; Trepel, J.; Das, R.; Jett, M.; Mulshine, J. L. Five-lipoxygenase inhibitors can mediate apoptosis in human breast cancer cell lines through complex eicosanoid interactions. *FASEB J.* **2001**, *15*, 2007-2009.
- [63] Avis, I. M.; Jett, M.; Boyle, T.; Vos, M. D.; Moody, T.; Treston, A. M.; Martinez, A.; Mulshine, J. L. Growth control of lung cancer by interruption of 5-lipoxygenase-mediated growth factor signaling. *J. Clin. Invest.* **1996**, *97*, 806-813.
- [64] Kargman, S.; Vickers, P. J.; Evans, J. F. A23187 induces translocation of 5-lipoxygenase in osteosarcoma cells. *J. Cell Biol.* **1992**, *119*, 1701-1709.
- [65] Boado, R. J.; Partridge, W. M.; Vinters, H. V.; Black, K. L. Differential expression of arachidonate 5-lipoxygenase transcripts in human brain tumors: evidence for the expression of a multitranscript family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 9044-9048.
- [66] Hennig, R.; Ding, X. Z.; Tong, W. G.; Schneider, M. B.; Standop, J.; Friess, H.; Buchler, M. W.; Pour, P. M.; Adrian, T. E. 5-Lipoxygenase and leukotriene B(4) receptor are expressed in human pancreatic cancers but not in pancreatic ducts in normal tissue. *Am. J. Pathol.* **2002**, *161*, 421-428.
- [67] Romano, M.; Catalano, A.; Nutini, M.; D'Urbano, E.; Crescenzi, C.; Clària, J.; Libner, R.; Davi, G.; Procopio, A. 5-lipoxygenase regulates malignant mesothelial cell survival: involvement of vascular endothelial growth factor. *FASEB J.* **2001**, *15*, 2326-2336.
- [68] Gupta, S.; Srivastava, M.; Ahmad, N.; Sakamoto, K.; Bostwick, D. G.; Mukhtar, H. Lipoxygenase-5 is overexpressed in prostate adenocarcinoma. *Cancer* **2001**, *91*, 737-743.
- [69] Ohd, J. F.; Nielsen, C. K.; Campbell, J.; Landberg, G.; Lofberg, H.; Sjolander, A. Expression of the leukotriene D₄ receptor CysLT₁, COX-2, and other cell survival factors in colorectal adenocarcinomas. *Gastroenterology* **2003**, *124*, 57-70.
- [70] Lee, E.; Robertson, T.; Smith, J.; Kilfeather, S. Leukotriene receptor antagonists and synthesis inhibitors reverse survival in eosinophils of asthmatic individuals. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2000**, *161*, 1881-1886.
- [71] Walker, J. L.; Loscalzo, J.; Zhang, Y. Y. 5-Lipoxygenase and human pulmonary artery endothelial cell proliferation. *Am. J. Physiol.* **2002**, *282*, 585-593.
- [72] Uz, T.; Manev, R.; Manev, H. 5-Lipoxygenase is required for proliferation of immature cerebellar granule neurons *in vitro*. *Eur. J. Pharmacol.* **2001**, *418*, 15-22.
- [73] Ou, D.; Bonomi, P.; Jao, W.; Jadko, S.; Harris, J. E.; Anderson, K. M. The mode of cell death in H-358 lung cancer cells cultured with inhibitors of 5-lipoxygenase or the free radical spin trap, NTBN. *Cancer Lett.* **2001**, *166*, 223-231.
- [74] Ghosh, J.; Myers, C. E. Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 13182-13187.
- [75] Anderson, K. M.; Seed, T.; Meng, J.; Ou, D.; Alrefai, W. A.; Harris, J. E. Five-lipoxygenase inhibitors reduce Panc-1 survival: the mode of cell death and synergism of MK886 with gamma linolenic acid. *Anticancer Res.* **1998**, *18*, 791-800.
- [76] Tsukada, T.; Nakashima, K.; Shirakawa, S. Arachidonate 5-lipoxygenase inhibitors show potent antiproliferative effects on human leukemia cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1986**, *140*, 832-836.
- [77] Titos, E.; Clària, J.; Planagumà, A.; López-Parra, M.; Villamor, N.; Parrizas, M.; Carrió, A.; Miquel, R.; Jiménez, W.; Arroyo, V.; Rivera, F.; Rodés, J. Inhibition of 5-Lipoxygenase Induces Cell Growth Arrest and Apoptosis in Rat Kupffer Cells. Implications in liver fibrosis. *FASEB J.* **2003**, *17*, 1745-1747.
- [78] Catalano, A.; Caprari, P.; Soddu, S.; Procopio, A.; Romano, M. 5-Lipoxygenase antagonizes p53-induced apoptosis of cancer cells by altering p53 nuclear trafficking. *FASEB J.* **2004**, *18*, 1740-1742.
- [79] Baud, L.; Sraer, J.; Perez, J.; Nivez, M. P.; Ardaillou, R. Leukotriene C₄ binds to human glomerular epithelial cells and promotes their proliferation *in vitro*. *J. Clin. Invest.* **1985**, *76*, 374-377.
- [80] Baud, L.; Perez, J.; Denis, M.; Ardaillou, R. Modulation of fibroblast proliferation by sulfidopeptide leukotrienes: effect of indomethacin. *J. Immunol.* **1987**, *138*, 1190-1195.
- [81] Yamaoka, K. A.; Claesson, H. E.; Rosen, A. Leukotriene B₄ enhances activation, proliferation, and differentiation of human B lymphocytes. *J. Immunol.* **1989**, *143*, 1996-2000.
- [82] Leikauf, G. D.; Claesson, H. E.; Doupnik, C. A.; Hybbinette, A.; Grafstrom, R. C. Cysteinyl leukotrienes enhance growth of human airway epithelial cells. *Am. J. Physiol.* **1990**, *259*, L255-261.
- [83] Palmberg, L.; Lindgren, J. A.; Thyberg, J.; Claesson, H. E. On the mechanism of induction of DNA synthesis in cultured arterial smooth muscle cells by leukotrienes. Possible role of prostaglandin endoperoxide synthase products and platelet-derived growth factor. *J. Cell Sci.* **1991**, *98*, 141-149.

- [84] Kragballe, K.; Desjarlais, L.; Voohees, J. J. Leukotrienes B₄, C₄ and D₄ stimulate DNA synthesis in cultured human epidermal keratinocytes. *Br. J. Dermatol.* **1985**, *113*, 43-52.
- [85] Moretti, R. M.; Montagnani Marelli, M.; Sala, A.; Motta, M.; Limonta, P. Activation of the orphan nuclear receptor ROR α counteracts the proliferative effect of fatty acids on prostate cancer cells: crucial role of 5-lipoxygenase. *Int. J. Cancer* **2004**, *112*, 87-93.
- [86] Ghosh, J.; Myers, C. E. Arachidonic acid stimulates prostate cancer cell growth: critical role of 5-lipoxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *235*, 418-423.
- [87] Provost, P.; Samuelsson, B.; Radmark, O. Interaction of 5-lipoxygenase with cellular proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 1881-1885.
- [88] Lepley, R. A.; Fitzpatrick, F. A. 5-Lipoxygenase contains a functional Src homology 3-binding motif that interacts with the Src homology 3 domain of Grb2 and cytoskeletal proteins. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 24163-24168.
- [89] Cao, Y.; Pearman, A. T.; Zimmerman, G. A.; McIntyre, T. M.; Prescott, S. M. Intracellular unesterified arachidonic acid signals apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 11280-11285.
- [90] Tang, D. G.; Chen, Y. Q.; Honn, K. V. Arachidonate lipoxygenases as essential regulators of cell survival and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 5241-5246.
- [91] Datta, K.; Biswal, S. S.; Kehrer, J. P. The 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP) inhibitor, MK886, induces apoptosis independently of FLAP. *Biochem. J.* **1999**, *340*, 371-375.
- [92] Yamamoto, S.; Suzuki, H.; Ueda, N. Arachidonate 12-lipoxygenases. *Prog. Lipid Res.* **1997**, *36*, 23-41.
- [93] Yoshimoto, T.; Takahashi, Y. Arachidonate 12-lipoxygenases. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **2002**, *68-69*, 245-262.
- [94] Funk, C. D.; Furci, L.; Fitzgerald, G. A. Molecular cloning, primary structure, and expression of the human platelet/erythrocyte cell 12-lipoxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 5638-5642.
- [95] Watanabe, T.; Medina, J. F.; Haeggstrom, J. Z.; Radmark, O.; Samuelsson, B. Molecular cloning of a 12-lipoxygenase cDNA from rat brain. *Eur. J. Biochem.* **1993**, *212*, 605-612.
- [96] De Marzo, N.; Sloane, D. L.; Dicharry, S.; Highland, E.; Sigal, E. Cloning and expression of an airway epithelial 12-lipoxygenase. *Am. J. Physiol.* **1992**, *262*, L198-207.
- [97] Nie, D.; Honn, K. V. Cyclooxygenase, lipoxygenase and tumor angiogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, *59*, 799-807.
- [98] Nie, D.; Che, M.; Grignon, D.; Tang, K.; Honn, K. V. Role of eicosanoids in prostate cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* **2001**, *20*, 195-206.
- [99] Natarajan, R.; Esworthy, R.; Bai, W.; Gu, J. L.; Wilczynski, S.; Nadler, J. Increased 12-lipoxygenase expression in breast cancer tissues and cells. Regulation by epidermal growth factor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1997**, *82*, 1790-1798.
- [100] Krieg, P.; Kinzig, A.; Röss-Loschke, M.; Vogel, S.; Vanlandingham, B.; Stephan, M.; Lehmann, W. D.; Marks, F.; Furstemberger, G. 12-Lipoxygenase isoenzymes in mouse skin tumor development. *Mol. Carcinog.* **1995**, *14*, 118-129.
- [101] Chen, Y. Q.; Duniec, Z. M.; Liu, B.; Hagmann, W.; Gao, X.; Shimoji, K.; Marnett, L. J.; Johnson, C. R.; Honn, K. V. Endogenous 12(S)-HETE production by tumor cells and its role in metastasis. *Cancer Res.* **1994**, *54*, 1574-1579.
- [102] Steele, V. E.; Holmes, C. A.; Hawk, E. T.; Kopelovich, L.; Lubet, R. A.; Crowell, J. A.; Sigman, C. C.; Kelloff, G. J. Lipoxygenase inhibitors as potential cancer chemopreventives. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **1999**, *8*, 467-483.
- [103] Liu, X. H.; Connolly, J. M.; Rose, D. P. The 12-lipoxygenase gene-transfected MCF-7 human breast cancer cell line exhibits estrogen-independent, but estrogen and omega-6 fatty acid-stimulated proliferation *in vitro*, and enhanced growth in athymic nude mice. *Cancer Lett.* **1996**, *109*, 223-230.
- [104] Brash, A. R. Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 23679-23682.
- [105] Brash, A. R.; Boeglin, W. E.; Chang, M. S. Discovery of a second 15S-lipoxygenase in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 6148-6152.
- [106] Kelavkar, U. P.; Cohen, C.; Kamitani, H.; Eling, T. E.; Badr, K. F. Concordant induction of 15-lipoxygenase-1 and mutant p53 expression in human prostate adenocarcinoma: correlation with Gleason staging. *Carcinogenesis* **2000**, *21*, 1777-1787.
- [107] Shappell, S. B.; Boeglin, W. E.; Olson, S. J.; Kasper, S.; Brash, A. R. 15-lipoxygenase-2 (15-LOX-2) is expressed in benign prostatic epithelium and reduced in prostate adenocarcinoma. *Am. J. Pathol.* **1999**, *155*, 235-245.
- [108] His, L. C.; Wilson, L. C.; Eling, T. E. Opposing Effects of 15-Lipoxygenase-1 and -2 Metabolites on MAPK Signaling in Prostate. Alteration in peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 40549-40556.
- [109] Shappell, S. B.; Gupta, R. A.; Manning, S.; Whitehead, R.; Boeglin, W. E.; Schneider, C.; Case, T.; Price, J.; Jack, G. S.; Wheeler, T. M.; Matusik, R. J.; Brash, A. R.; DuBois, R. N. 15S-Hydroxyeicosatetraenoic acid activates peroxisome proliferator-activated receptor gamma and inhibits proliferation in PC3 prostate carcinoma cells. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 497-503.
- [110] Argentieri, D. C.; Ritchie, D. M.; Ferro, M. P.; Kirchner, T.; Wachter, M. P.; Anderson, D. W.; Rosenthale, M. E.; Capetola, R. J. Tepoxalin: a dual cyclooxygenase/5-lipoxygenase inhibitor of arachidonic acid metabolism with potent anti-inflammatory activity and a favorable gastrointestinal profile. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1994**, *271*, 1399-1408.
- [111] Fiorucci, S.; Meli, R.; Bucci, M.; Cirino, G. Dual inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. A new avenue in anti-inflammatory therapy? *Biochem. Pharmacol.* **2001**, *62*, 1433-1438.
- [112] Janusz, J. M.; Young, P. A.; Ridgeway, J. M.; Scherz, M. W.; Enzweiler, K.; Wu, L. I.; Gan, L.; Darolia, R.; Matthews, R. S.; Hennes, D.; Kellstein, D. E.; Green, S. A.; Tulich, J. L.; Rosario-Jansen, T.; Magrisso, I. J.; Wehmeyer, K. R.; Kuhlenbeck, D. L.; Eichhold, T. H.; Dobson, R. L.; Sirko, S. P.; Farmer, R. W. New cyclooxygenase-2/5-lipoxygenase inhibitors. I. 7-tert-butyl-1,2,3-dihydro-3,3-dimethylbenzofuran derivatives as gastrointestinal safe antiinflammatory and analgesic agents: discovery and variation of the 5-keto substituent. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1112-1123.
- [113] Inagaki, M.; Tsuru, T.; Jooyama, H.; Ono, T.; Yamada, K.; Kobayashi, M.; Hori, Y.; Arimura, A.; Yasui, K.; Ohno, K.; Kakudo, S.; Koizumi, K.; Suzuki, R.; Kawai, S.; Kato, M.; Matsumoto, S. Novel antiarthritic agents with 1,2-isothiazolidine-1,1-dioxide (gamma-sultam) skeleton: cytokine suppressive dual inhibitors of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2040-2048.
- [114] Kirchner, T.; Argentieri, D. C.; Barbone, A. G.; Singer, M.; Steber, M.; Ansell, J.; Beers, S. A.; Watcher, M. P.; Wu, W.; Malloy, E.; Stewart, A.; Ritchie, D. M. Evaluation of the antiinflammatory activity of a dual cyclooxygenase-2 selective/5-lipoxygenase inhibitor, RWJ 63556, in a canine model of inflammation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1997**, *282*, 1094-1101.
- [115] Horizoe, T.; Nagakura, N.; Chiba, K.; Shiota, H.; Shinoda, M.; Kobayashi, N.; Numata, H.; Okamoto, Y.; Kobayashi, S. ER-34122, a novel dual 5-lipoxygenase/cyclooxygenase inhibitor with potent anti-inflammatory activity in an arachidonic acid-induced ear inflammation model. *Inflamm. Res.* **1998**, *47*, 375-383.
- [116] Horizoe, T.; Nagakura, N.; Chiba, K.; Shiota, H.; Shinoda, M.; Numata, H.; Kobayashi, S.; Abe, C. Effects of ER-34122, a novel dual 5-lipoxygenase/cyclooxygenase inhibitor, on indices of early articular lesion in MRL/MpJ-lpr/lpr mice. *Inflamm. Res.* **1999**, *48*, 432-436.
- [117] Tries, S.; Neupert, W.; Laufer, S. The mechanism of action of the new antiinflammatory compound ML3000: inhibition of 5-LOX and COX-1/2. *Inflamm. Res.* **2002**, *51*, 135-143.
- [118] Laufer, S. A.; Augustin, J.; Dannhardt, G.; Kiefer, W. (6,7-Diaryldihydropyrrolizin-5-yl)acetic acids, a novel class of potent dual inhibitors of both cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1894-1897.
- [119] Wallace, J. L.; Carter, L.; McKnight, W.; Tries, S.; Laufer, S. ML 3000 reduces gastric prostaglandin synthesis without causing mucosal injury. *Eur. J. Pharmacol.* **1994**, *271*, 525-531.
- [120] Bertolini, A.; Ottani, A.; Sandrini, M. Dual acting anti-inflammatory drugs: a reappraisal. *Pharmacol. Res.* **2001**, *44*, 437-450.
- [121] Celotti, F.; Durand, T. The metabolic effects of inhibitors of 5-lipoxygenase and of cyclooxygenase 1 and 2 are an advancement in the efficacy and safety of anti-inflammatory therapy. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **2003**, *71*, 147-162.
- [122] Charlier, C.; Michaux, C. Dual inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) and 5-lipoxygenase (5-LOX) as a new strategy to provide safer non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Eur. J. Med. Chem.* **2003**, *38*, 645-659.
- [123] Boiveau, C.; Pelletier, J. P.; Tardif, G.; Fahmi, H.; Laufer, S.; Lavigne, M.; Martel-Pelletier, J. The regulation of human MMP-13 by licofelone, an inhibitor of cyclo-oxygenases and 5-lipoxygenase,

- in human osteoarthritic chondrocytes is mediated by the inhibition of the p38 MAP kinase signalling pathway. *Ann. Rheum. Dis.* **2005**, *64*, 891-898.
- [124] Jovanovic, D. V.; Fernandes, J. C.; Martel-Pelletier, J.; Jolicoeur, F. C.; Reboul, P.; Laufer, S.; Tries, S.; Pelletier, J. P. *In vivo* dual inhibition of cyclooxygenase and lipoxygenase by ML-3000 reduces the progression of experimental osteoarthritis: suppression of collagenase 1 and interleukin-1 β synthesis. *Arthritis Rheum.* **2001**, *44*, 2320-2330.
- [125] Chiang, N.; Arita, M.; Serhan, C. N. Anti-inflammatory circuitry: Lipoxin, aspirin-triggered lipoxins and their receptor ALX. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **2005**, *73*, 163-177.
- [126] Marcus, A. J. Transcellular metabolism of eicosanoids. *Prog. Hemost. Thromb.* **1986**, *8*, 127-142.
- [127] Serhan, C. N.; Sheppard, K. A. Lipoxin formation during human neutrophil-platelet interactions. Evidence for the transformation of leukotriene A₄ by platelet 12-lipoxygenase *in vitro*. *J. Clin. Invest.* **1990**, *85*, 772-780.
- [128] Serhan, C. N.; Romano, M. Lipoxin biosynthesis and actions: role of the human platelet LX-synthase. *J. Lipid. Mediat. Cell Signal.* **1995**, *12*, 293-306.
- [129] Serhan, C. N.; Hamberg, M.; Samuelsson, B. Lipoxins: novel series of biologically active compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 5335-5339.
- [130] Clària, J.; Lee, M. H.; Serhan, C. N. Aspirin-triggered lipoxins (15-epi-LX) are generated by the human lung adenocarcinoma cell line (A549)-neutrophil interactions and are potent inhibitors of cell proliferation. *Mol. Med.* **1996**, *2*, 583-596.
- [131] Levy, B. D.; Clish, C. B.; Schmidt, B.; Gronert, K.; Serhan, C. N. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nat. Immunol.* **2001**, *2*, 612-619.
- [132] Bannenberg, G. L.; Chiang, N.; Ariel, A.; Arita, M.; Tjonahen, E.; Gotlinger, K. H.; Hong, S.; Serhan, C. N. Molecular circuits of resolution: formation and actions of resolvins and protectins. *J. Immunol.* **2005**, *174*, 4345-4355.
- [133] Chavis, C.; Vachier, I.; Chanez, P.; Bousquet, J.; Godard, P. 5(S),15(S)-dihydroxyeicosatetraenoic acid and lipoxin generation in human polymorphonuclear cells: dual specificity of 5-lipoxygenase towards endogenous and exogenous precursors. *J. Exp. Med.* **1996**, *183*, 1633-1643.
- [134] Clària, J.; Titos, E.; Jiménez, W.; Ros, J.; Ginès, P.; Arroyo, V.; Rivera, F.; Rodés, J. Altered biosynthesis of leukotrienes and lipoxins and host defense disorders in patients with liver cirrhosis. *Gastroenterology* **1998**, *115*, 147-156.
- [135] Clària, J.; Serhan, C. N. Aspirin triggers previously undescribed bioactive eicosanoids by human endothelial cell-leukocyte interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 9475-9479.
- [136] Lee, T. H.; Horton, C. E.; Kyan-Aung, U.; Haskard, D.; Crea, A. E.; Spur, B. W. Lipoxin A₄ and lipoxin B₄ inhibit chemotactic responses of human neutrophils stimulated by leukotriene B₄ and N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine. *Clin. Sci.* **1989**, *77*, 195-203.
- [137] Colgan, S. P.; Serhan, C. N.; Parkos, C. A.; Delp-Archer, C.; Madara, J. L. Lipoxin A₄ modulates transmigration of human neutrophils across intestinal epithelial monolayers. *J. Clin. Invest.* **1993**, *92*, 75-82.
- [138] Papayianni, A.; Serhan, C. N.; Brady, H. R. Lipoxin A₄ and B₄ inhibit leukotriene-stimulated interactions of human neutrophils and endothelial cells. *J. Immunol.* **1996**, *56*, 2264-2272.
- [139] Gronert, K.; Gewirtz, A.; Madara, J. L.; Serhan, C. N. Identification of a human enterocyte lipoxin A₄ receptor that is regulated by interleukin (IL)-13 and interferon gamma and inhibits tumor necrosis factor alpha-induced IL-8 release. *J. Exp. Med.* **1998**, *187*, 1285-1294.
- [140] Hachicha, M.; Pouliot, M.; Petasis, N. A.; Serhan, C. N. Lipoxin (LX)A₄ and aspirin-triggered 15-epi-LXA₄ inhibit tumor necrosis factor 1 α -initiated neutrophil responses and trafficking: regulators of a cytokine-chemokine axis. *J. Exp. Med.* **1999**, *189*, 1923-1930.
- [141] Planagumà, A.; Titos, E.; López-Parra, M.; Gaya, J.; Pueyo, G.; Arroyo, V.; Clària, J. Aspirin (ASA) regulates 5-lipoxygenase activity and peroxisome proliferator-activated receptor α -mediated CINC-1 release in rat liver cells: novel actions of lipoxin A₄ (LXA₄) and ASA-triggered 15-epi-LXA₄. *FASEB J.* **2002**, *16*, 1937-1939.
- [142] Scalia, R.; Gefen, J.; Petasis, N. A.; Serhan, C. N.; Lefer, A. M. Lipoxin A₄ stable analogs inhibit leukocyte rolling and adherence in the rat mesenteric microvasculature: role of P-selectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 9967-9972.
- [143] Takano, T.; Clish, C. B.; Gronert, K.; Petasis, N. A.; Serhan, C. N. Neutrophil-mediated changes in vascular permeability are inhibited by topical application of aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A₄ and novel lipoxin B₄ stable analogues. *J. Clin. Invest.* **1998**, *101*, 819-826.
- [144] Takano, T.; Fiore, S.; Maddox, J. F.; Brady, H. R.; Petasis, N. A.; Serhan, C. N. Aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A₄ (LXA₄) and LXA₄ stable analogues are potent inhibitors of acute inflammation: evidence for anti-inflammatory receptors. *J. Exp. Med.* **1997**, *185*, 693-704.
- [145] Kieran, N. E.; Maderna, P.; Godson, C. Lipoxins: potential anti-inflammatory, proresolution, and antifibrotic mediators in renal disease. *Kidney Int.* **2004**, *65*, 1145-1154.
- [146] Pouliot, M.; Clish, C. B.; Petasis, N. A.; Van Dyke, T. E.; Serhan, C. N. Lipoxin A(4) analogues inhibit leukocyte recruitment to *Porphyromonas gingivalis*: a role for cyclooxygenase-2 and lipoxins in periodontal disease. *Biochemistry* **2000**, *39*, 4761-4768.
- [147] Van Dyke, T. E.; Serhan, C. N. Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. *J. Dent. Res.* **2003**, *82*, 82-90.
- [148] Chiang, N.; Gronert, K.; Clish, C. B.; O'Brien, J. A.; Freeman, M. W.; Serhan, C. N. Leukotriene B₄ receptor transgenic mice reveal novel protective roles for lipoxins and aspirin-triggered lipoxins in reperfusion. *J. Clin. Invest.* **1999**, *104*, 309-316.
- [149] Levy, B. D.; De Sanctis, G. T.; Devchand, P. R.; Kim, E.; Ackerman, K.; Schmidt, B. A.; Szczeklik, W.; Drazen, J. M.; Serhan, C. N. Multi-pronged inhibition of airway hyper-responsiveness and inflammation by lipoxin A(4). *Nature Med.* **2002**, *8*, 1018-1023.
- [150] Karp, C. L.; Flick, L. M.; Park, K. W.; Softic, S.; Greer, T. M.; Keledjian, R.; Yang, R.; Uddin, J.; Guggino, W. B.; Atabani, S. F.; Belkaid, Y.; Xu, Y.; Whittsett, J. A.; Accurso, F. J.; Wills-Karp, M.; Petasis, N. A. Defective lipoxin-mediated anti-inflammatory activity in the cystic fibrosis airway. *Nat. Immunol.* **2004**, *5*, 388-392.
- [151] Fiorucci, S.; Wallace, J. L.; Mencarelli, A.; Distrutti, E.; Rizzo, G.; Farneti, S.; Morelli, A.; Tseng, J. L.; Suramanyam, B.; Guilford, W. J.; Parkinson, J. F. A beta-oxidation-resistant lipoxin A₄ analog treats hapten-induced colitis by attenuating inflammation and immune dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 15736-15741.
- [152] Fierro, I. M.; Kutok, J. L.; Serhan, C. N. Novel lipid mediator regulators of endothelial cell proliferation and migration: aspirin-triggered-15R-lipoxin A(4) and lipoxin A(4). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, *300*, 385-392.
- [153] Fierro, I. M. Angiogenesis and lipoxins. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **2005**, *73*, 271-275.
- [154] McMahon, B.; Stenson, C.; McPhillips, F.; Fanning, A.; Brady, H. R.; Godson, C. Lipoxin A₄ antagonizes the mitogenic effects of leukotriene D₄ in human renal mesangial cells. Differential activation of MAP kinases through distinct receptors. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 27566-27575.
- [155] Mitchell, D.; Rodgers, K.; Hanly, J.; McMahon, B.; Brady, H. R.; Martin, F.; Godson, C. Lipoxins inhibit Akt/PKB activation and cell cycle progression in human mesangial cells. *Am. J. Pathol.* **2004**, *164*, 937-946.
- [156] McMahon, B.; Mitchell, D.; Shattock, R.; Martin, F.; Brady, H. R.; Godson, C. Lipoxin, leukotriene, and PDGF receptors cross-talk to regulate mesangial cell proliferation. *FASEB J.* **2002**, *16*, 1817-1819.
- [157] Cezar-de-Mello, P. F.; Nascimento-Silva, V.; Villela, C. G.; Fierro, I. M. Aspirin-triggered Lipoxin A(4) inhibition of VEGF-induced endothelial cell migration involves actin polymerization and focal adhesion assembly. *Oncogene* **2005**, *25*, 122-129.
- [158] Wu, S. H.; Lu, C.; Dong, L.; Zhou, G. P.; He, Z. G.; Chen, Z. Q. High dose of lipoxin A₄ induces apoptosis in rat renal interstitial fibroblasts. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **2005**, *73*, 127-137.
- [159] Jozsef, L.; Zouki, C.; Petasis, N. A.; Serhan, C. N.; Filep, J. G. Lipoxin A₄ and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A₄ inhibit peroxynitrite formation, NF- κ B and AP-1 activation, and IL-8

- gene expression in human leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 13266-13271.
- [160] Sodin-Semrl, S.; Tadeo, B.; Tseng, D.; Varga, J.; Fiore, S. Lipoxin A4 inhibits IL-1 beta-induced IL-6, IL-8, and matrix metalloproteinase-3 production in human synovial fibroblasts and enhances synthesis of tissue inhibitors of metalloproteinases. *J. Immunol.* **2000**, *164*, 2660-2666.
- [161] Straus, D. S.; Glass, C. K. Cyclopentenone prostaglandins: new insights on biological activities and cellular targets. *Med. Res. Rev.* **2001**, *21*, 185-210.
- [162] Forman, B. M.; Tontonoz, P.; Chen, J.; Brun, R. P.; Spiegelman, B. M.; Evans, R. M. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* **1995**, *83*, 803-812.
- [163] Cernuda-Morollon, E.; Pineda-Molina, E.; Canada, F. J.; Perez-Sala, D. 15-Deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2 inhibition of NF-kappaB-DNA binding through covalent modification of the p50 subunit. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 35530-35536.
- [164] Thieringer, R.; Fenyk-Melody, J. E.; Le Grand, C. B.; Shelton, B. A.; Detmers, P. A.; Somers, E. P.; Carbin, L.; Moller, D. E.; Wright, S. D.; Berger, J. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma does not inhibit IL-6 or TNF-alpha responses of macrophages to lipopolysaccharide *in vitro* or *in vivo*. *J. Immunol.* **2000**, *164*, 1046-1054.
- [165] Tsubouchi, Y.; Kawahito, Y.; Kohno, M.; Inoue, K.; Hla, T.; Sano, H. Feedback control of the arachidonate cascade in rheumatoid synoviocytes by 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *283*, 750-755.
- [166] Quraishi, O.; Mancini, J. A.; Riendeau, D. Inhibition of inducible prostaglandin E(2) synthase by 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) and polyunsaturated fatty acids. *Biochem. Pharmacol.* **2002**, *63*, 1183-1189.
- [167] Gilroy, D. W.; Lawrence, T.; Perretti, M.; Rossi, A. G. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 401-416.
- [168] Clay, C. E.; Namen, A. M.; Atsumi, G.; Willingham, M. C.; High, K. P.; Kute, T. E.; Trimboli, A. J.; Fonteh, A. N.; Dawson, P. A.; Chilton, F. H. Influence of J series prostaglandins on apoptosis and tumorigenesis of breast cancer cells. *Carcinogenesis* **1999**, *20*, 1905-1911.
- [169] Wilmer, W. A.; Dixon, C.; Lu, L.; Hilbelink, T.; Rovin, B. H. A cyclopentenone prostaglandin activates mesangial MAP kinase independently of PPARgamma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *281*, 57-62.
- [170] Bishop-Bailey, D.; Hla, T. Endothelial cell apoptosis induced by the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) ligand 15-deoxy-Delta12, 14-prostaglandin J2. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 17042-17048.
- [171] Kawahito, Y.; Kondo, M.; Tsubouchi, Y.; Hashiramoto, A.; Bishop-Bailey, D.; Inoue, K.; Kohno, M.; Yamada, R.; Hla, T.; Sano, H. 15-deoxy-^{12,14}-PGJ₂ induces synoviocyte apoptosis and suppresses adjuvant-induced arthritis in rats. *J. Clin. Invest.* **2000**, *106*, 189-197.
- [172] Planagumà, A.; Clària, J.; Miquel, R.; López-Parra, M.; Titos, E.; Masferrer, J. L.; Arroyo, V.; Rodés, J. Inhibition of COX-2 reduces liver fibrosis by mechanisms involving kupffer cell apoptosis and PPARγ activation. *FASEB J.* **2005**, *19*, 1120-1122.
- [173] Gilroy, D. W.; Colville-Nash, P. R.; McMaster, S.; Sawatzky, D. A.; Willoughby, D. A.; Lawrence, T. Inducible cyclooxygenase-derived 15- deoxy(Delta)12-14PGJ2 brings about acute inflammatory resolution in rat pleurisy by inducing neutrophil and macrophage apoptosis. *FASEB J.* **2003**, *17*, 2269-2271.
- [174] Ward, C.; Dransfield, I.; Murray, J.; Farrow, S. N.; Haslett, C.; Rossi, A. G. Prostaglandin D2 and its metabolites induce caspase-dependent granulocyte apoptosis that is mediated via inhibition of I kappa B alpha degradation using a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-independent mechanism. *J. Immunol.* **2002**, *168*, 6232-6243.
- [175] Li, L.; Tao, J.; Davaille, J.; Feral, C.; Mallat, A.; Rieusset, J.; Vidal, H.; Lotersztajn, S. 15-deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2 induces apoptosis of human hepatic myofibroblasts. A pathway involving oxidative stress independently of peroxisome-proliferator-activated receptors. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 38152-38158.
- [176] Emi, M.; Maeyama, K. The biphasic effects of cyclopentenone prostaglandins, prostaglandin J(2) and 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) on proliferation and apoptosis in rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *67*, 1259-1267.
- [177] Kondo, M.; Shibata, T.; Kumagai, T.; Osawa, T.; Shibata, N.; Kobayashi, M.; Sasaki, S.; Iwata, M.; Noguchi, N.; Uchida, K. 15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2): the endogenous electrophile that induces neuronal apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 7367-7372.
- [178] Castrillo, A.; Traves, P. G.; Martin-Sanz, P.; Parkinson, S.; Parker, P. J.; Bosca, L. Potentiation of protein kinase C zeta activity by 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J(2) induces an imbalance between mitogen-activated protein kinases and NF-kappa B that promotes apoptosis in macrophages. *Mol. Cell. Biol.* **2003**, *23*, 1196-1208.
- [179] Oliva, J. L.; Perez-Sala, D.; Castrillo, A.; Martinez, N.; Canada, F. J.; Bosca, L.; Rojas, J. M. The cyclopentenone 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 binds to and activates H-Ras. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 4772-4777.
- [180] Millan, O.; Rico, D.; Painado, H.; Zarich, N.; Stamatakis, K.; Perez-Sala, D.; Rojas, J. M.; Cano, A.; Bosca, L. Potentiation of tumor formation by topical administration of 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 in a model of skin carcinogenesis. *Carcinogenesis* **2006**, *27*, 328-336.

Agradecimientos

Sin duda, esta es la parte que más me ha costado redactar, por lo difícil que resulta expresar con palabras la gratitud que siento hacia todas las personas que, por razones muy diversas, habéis hecho posible que esta tesis haya llegado a buen puerto.

En primer lugar quiero agradecer al Dr. Joan Clària la oportunidad que me brindó hace casi 6 años, de unirme a su grupo de investigación y el esfuerzo que ha dedicado para guiarme hasta aquí. Joan, te agradezco que siempre me hayas exigido el máximo sin romper la cuerda, tu trabajo y dedicación me han permitido aprender lecciones muy valiosas.

Al Dr. Wladimiro Jiménez, Jefe del Servicio de Bioquímica y Genética Molecular del Hospital Clínic, y a la Dra. Montse Milà, Jefa de la Sección de Bioquímica Molecular, quiero agradecerles las facilidades ofrecidas para realizar una parte esencial de mi trabajo en este Servicio.

Quiero dar las gracias también al Dr. Juan Rodés, Catedrático de Medicina de la UB y al Dr. Vicente Arroyo, Catedrático de Medicina de la UB y Director de l'Institut de Malalties Digestives i Metabòliques del Hospital Clínic por estar al frente del grupo y creer firmemente en nuestro trabajo.

Por supuesto quiero dar mil gracias a mis compañeros de grupo, buenos amigos que me han apoyado y socorrido en toda clase de circunstancias, compartiendo alegrías y penas. A Esther y Marta, gracias, gracias, gracias por todo el cariño y los buenos consejos que siempre me dais. A Raquel, por las charlas y confidencias, por hacerme pasar algunos de los mejores momentos en el labo. A Marcos, por ser tan positivo, y por demostrarme cada día que merece la pena serlo. A Eva, Evis, por ser siempre tan sincera y espontánea, y arrancarme siempre una sonrisa. A Natàlia por su energía inagotable, tan contagiosa y su cariño, te admiro profundamente por tu tesón y tu amor por la investigación. También quiero dar las gracias a Anna P. y desearle muchos éxitos en su nueva carrera. Por supuesto, a Montse Bernat porque siempre se ha preocupado por mí, me ha ayudado y aconsejado siempre bien, Montse es un

gusto estar cerca de ti por la paz y el buen rollo que transmites y a Anabel, por ayudarme siempre.

También quiero agradecer a mis compañeros y amigos Jordi, Montse (los dos me habéis alegrado mucho la dura recta final), Vedrana, Javi y Pedro que me hayan escuchado y ayudado, ya sabéis que he pasado muy buenos ratos con vosotros y os aprecio un montón, muchos ánimos en vuestros respectivos proyectos. A la Dra. Sònia Tugues por ser una buena amiga, vas a llegar tan lejos como te propongas, por tu calidad humana y profesional. No quiero dejarme a mis compañeros del laboratorio 503, Montse, Elena, Cristina, Raquel y Jordi, con quienes he compartido muchos momentos y que han aguantado con una paciencia infinita mis constantes idas y venidas para usar su impresora, y a Marlene y Pau, que aunque ahora no están han sido unos compañeros formidables de quienes siempre voy a guardar muy buen recuerdo.

Al Dr. Ramón Bataller quiero darle las gracias por su amabilidad y simpatía durante todos estos años. A las Dras. Marce Párrizas, Montserrat Batlle y Loreto Boix, por haberme brindado siempre su ayuda, con una sonrisa y dándome ánimos para seguir adelante. A la Dra. Pepa Ros por sus palabras y su experiencia, que han sido de gran ayuda. Al Dr. Guillermo Fernández por ser siempre tan amable conmigo, y a Marc, Isa, Elisabeth y Marta por ser también compañeros de batallas y brindarme siempre una sonrisa.

Necesito dar las gracias también a mis amigos, porque con ellos puedo disfrutar de las cosas buenas y superar las malas. A Gemma V. (Tita, no sé què faria sense tu, tinc molta sort de tenir-te a prop) Anna, Gemma G., por preocuparos siempre por mí, escucharme y quererme incondicionalmente. Us estimo molt!! A Nacho y Sonia, por todos los momentos que hemos pasado juntos, los findes de Open y tapitas en el bar rosa, los viajes, Cala Montjoi...en fin, tantos momentos inolvidables que he pasado con vosotros. A Rafa y Marga, por el cariño que me demostráis siempre, ¡qué pena me da teneros tan lejos y veros tan de tarde en tarde! A mis

amigos Irene (eres una gran amiga y confidente, mucha suerte en esta nueva etapa, ¡te voy a echar muchísimo de menos! Pero no te voy a perder la pista), Juan, Javito, Klaas, Mire y Anabel, que conocí en la facultad de Biología, y me han ido acompañando a distancia a lo largo del camino.

Pero por encima de todo quiero agradecer a mi familia: mamá, papá, Guillermo, yayos, tíos y tías, primos y primas que crean tanto en mí, mucho más que yo, y me demuestran siempre cuánto me quieren. Me apoyáis y os sentís orgullosos de mí en todo momento, aunque no sepa explicaros muy bien qué hago. Os quiero muchísimo. Sin vosotros esto no hubiera sido posible. Nada sería posible.

A todos y cada uno de vosotros...¡MUCHAS GRACIAS!

Let me lie down
Please don't wake me
Nothing is sacred
And no one saved me

In my black eye I can feel it
Moving closer
Can't you hear it

The only gift you gave to me
Was self-fulfilling prophecy
I need to change the sounds
That shape my life

And if you die before I leave
What on earth becomes of me
Look around there's no one here
To love me and hold me

Take me dancing
I love music
Keep on singing
We won't lose it

Picture me here
Missing no-one
If young hearts run free
Why can't we go on

Go on to till they kick us out
We've everything to talk about
I could bring a song into your life

If you should die before I leave
What on earth becomes of me
Look around there's no one here
To love me and hold me

Maybe I've been away too long
I know I'm not always right but is that wrong
They say there's nothing I can do
But talk to strangers and wait for you

R.W.