



# Papel del receptor nuclear PPAR $\gamma$ en la inflamación y la esteatosis hepática

Eva Morán Salvador

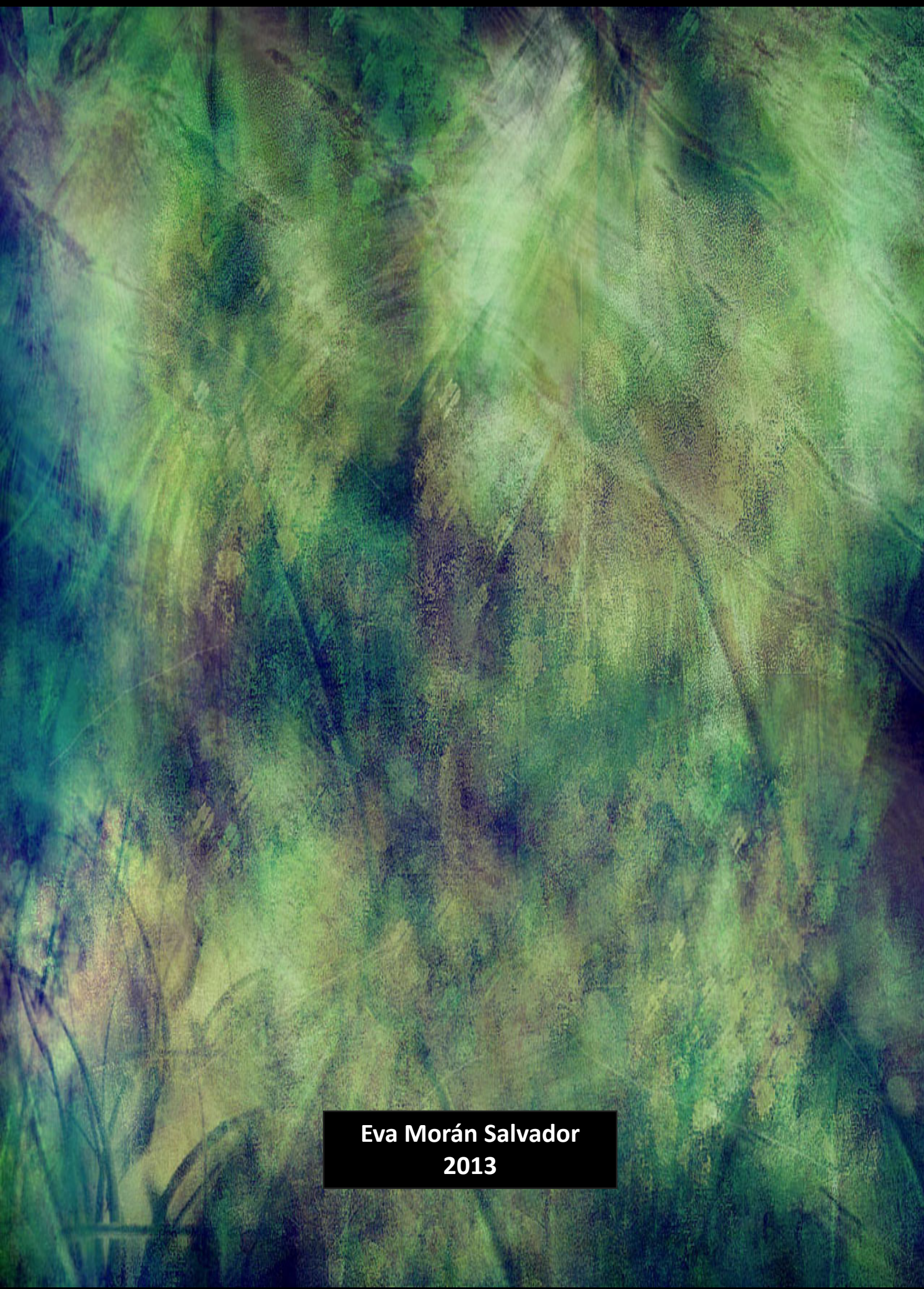


Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- Compartiqual 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - Compartiqual 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-ShareAlike 3.0. Spain License.**





Eva Morán Salvador  
2013

PAPPEL DEL RECEPTOR NUCLEAR PPAR $\gamma$  EN LA INFLAMACI3N Y LA ESTEATOSIS HEPATICA



EVA MORAN SALVADOR



PAPPEL DEL RECEPTOR NUCLEAR PPAR $\gamma$  EN LA INFLAMACI3N Y LA ESTEATOSIS HEPATICA

Eva Morán Salvador

2013



Tesis Doctoral  
Universidad de Barcelona  
Facultad de Medicina





UNIVERSIDAD DE BARCELONA

Programa de Doctorado en Biomedicina

Facultad de Medicina

**PAPEL DEL RECEPTOR NUCLEAR PPAR $\gamma$  EN LA INFLAMACI3N Y LA  
ESTEATOSIS HEP3TICA**

Memoria presentada por

**EVA MOR3N SALVADOR**

para optar al t3tulo de Doctora en Bioqu3mica

Trabajo realizado bajo la direcci3n del **Dr. Joan Cl3ria Enrich**, en el Servicio  
de Bioqu3mica y Gen3tica Molecular del Hospital Cl3nic de Barcelona

Eva Mor3n Salvador  
Doctoranda

Dr. Joan Cl3ria Enrich  
Director

Tesis inscrita en el Programa de Doctorado en Biomedicina en 2008

*"Science never solves a problem without creating ten more"*

*George Bernard Shaw*



A MIS TRES PILARES,

Mis padres y Silvia





CEH	Células estrelladas hepáticas
CK	Células de Kupffer
EHGNA	Enfermedad del hígado graso de origen no alcohólico
NK	Células citotóxicas <i>pit cells</i> o <i>natural killer</i>
IL	Interleuquina
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral-alfa
ROS	Especies reactivas del oxígeno
RI	Resistencia a la insulina
TG	Triglicéridos
MEC	Matriz Extracelular
TIMP	Metaloproteinasa
$\alpha$ -SMA	Proteína alfa actina de músculo liso
EHNA	esteatohepatitis no alcohólica
DM	Diabetes Mellitus
ALT	Alanina aminotransferasa
AST	Aspartato aminotransferasa
AGL	Ácidos grasos libres
AG	Ácidos grasos
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear- $\kappa$ B
IKK- $\beta$	Proteína quinasa inhibidora del factor nuclear $\kappa$ -beta
IRS	Proteína de señalización del receptor de insulina
HSL	Lipasa sensible a hormonas
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad ( <i>very low density lipoprotein</i> )
SREBP-1c	Proteína 1c de unión al elemento de respuesta a los esteroides
ChREBP	Proteína de unión al elemento de respuesta a los carbohidratos
ACC	Acetil-CoA carboxilasa
FAS	Sintasa de AG
SCD1	Esteroil-Coenzima A desaturasa 1
PPAR	Receptor activado por proliferadores de peroxisomas
PUFA	AG poliinsaturados
FABP	Proteínas de unión a AG
KO	Ratón genéticamente deficiente en la expresión de un gen, ratón <i>knockout</i>
TGF $\beta$	Factor de crecimiento tisular beta
4-HNE	4-hidroxinonanal

DRG	Dieta rica en grasa
CCl <sub>4</sub>	Tetracloruro de carbono
aP2	Proteína adiposa-2
LBD	Dominio de unión al ligando
TZDs	Tiazolidinedionas
LDH	Lactato deshidrogenasa
COX	Ciclooxigenasa









<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>I- FISIOLÓGÍA DEL HÍGADO</b>	<b>3</b>
1- El sinusoides hepático	3
2- Hepatocitos	4
3- Células de Kupffer (CK)	5
4- Célula Estrellada Hepática (CEH)	7
<b>II- ENFERMEDAD DEL HÍGADO GRASO DE ORIGEN NO ALCOHÓLICO (EHGNA)</b>	<b>8</b>
1- Prevalencia / Epidemiología	10
2- Manifestaciones clínicas	10
3- Evidencias histológicas	11
4- Etiopatogenia de la EHGNA	11
5- Inflamación hepática y las enfermedades asociadas	16
5.1. Factores implicados en la progresión de la EHNA	17
5.2. Fibrosis hepática	19
6- Influencia del tejido adiposo sobre las enfermedades hepáticas	20
7- Modelos experimentales para el estudio de la EHGNA y el daño hepático	21
7.1. Modelos experimentales para el estudio de la EHGNA	21
7.2. Modelo de inducción de inflamación y fibrosis hepática	23
<b>III- LOS RECEPTORES ACTIVADOS POR PROLIFERADORES DE PEROXISOMAS (PPARs)</b>	<b>25</b>
<b>IV- PPAR<math>\gamma</math></b>	<b>27</b>
1- Estructura de PPAR $\gamma$ murino	27
2- Mecanismos de acción de PPAR $\gamma$	29
2.1. Regulación de la actividad transcripcional de PPAR $\gamma$	29
2.2. Regulación de PPAR $\gamma$ por modificaciones covalentes	32
3- Ligandos de PPAR $\gamma$	36
3.1. Ligandos biológicos	36
3.2. Ligandos sintéticos	37
3.3. Moduladores sintéticos	38
4- Funciones de PPAR $\gamma$	38
5- Variantes genéticas humanas de PPAR $\gamma$	40
<b>V- EVIDENCIAS DEL PAPEL DE PPAR<math>\gamma</math> EN LA EHGNA</b>	<b>41</b>
1- Lecciones desde modelos animales	41
2- Ratones KO condicionales de PPAR $\gamma$ específicos de célula	43
3- PPAR $\gamma$ y la EHGNA	45

<b>VI- LAS TIAZOLIDINEDIONAS (TZDs)</b>	<b>50</b>
1- Mecanismos de las TZDs	50
2- La acción de las TZDs en los humanos	52
3- Efectos secundarios de las TZDs	54
<b>OBJETIVOS</b>	<b>55</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>59</b>
<b>ARTÍCULO 1</b>	
“Papel de PPAR $\gamma$ en la esteatosis hepática inducida por obesidad mediante el uso de ratones KO condicionales específicos de hepatocito y macrófago”	
Morán-Salvador E et al, <i>FASEB J</i> 25:2538-50, 2011.	61
<b>ARTÍCULO 2</b>	
“La deficiencia celular específica de PPAR $\gamma$ establece propiedades antiinflamatorias y antifibrogénicas para este receptor nuclear en las células no parenquimales del hígado”	
Morán-Salvador E et al, <i>J of Hepatol</i> 2013. doi: 10.1016/j.jhep.2013.06.023	79
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>133</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>141</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>145</b>
<b>ANEXO I: Figuras Adicionales del Artículo 2</b>	<b>157</b>
<b>ANEXO II: Material y Métodos</b>	<b>165</b>
<b>1- Ratones KO de PPAR<math>\gamma</math> condicionales de célula</b>	167
1.1. Ratones modificados genéticamente	168
1.2. Extracción de ADN genómico de tejido	168
1.3. Genotipado por PCR convencional	168
1.4. Genotipado por Análisis de fragmentos	169
<b>2- Estudios <i>in vivo</i></b>	169
2.1. Modelo experimental de inducción a la esteatosis hepática con DRG	169
2.2. Modelo crónico experimental de daño hepático con CCl <sub>4</sub>	169
2.3. Modelo agudo experimental de daño hepático con CCl <sub>4</sub>	170
2.4. Test de tolerancia a la glucosa (TTG)	170
2.5. Test de tolerancia a la insulina (TTI)	170

2.6. Sacrificio de los ratones	170
2.7. Análisis bioquímico	171
2.8. Determinación de AMP cíclico	171
<b>3- Estudios histológicos</b>	172
3.1. Determinación de la inflamación hepática por H&E	172
3.2. Determinación de la esteatosis hepática por tinción con Oil Red-O	173
3.3. Determinación de la fibrosis hepática por tinción con Sirius Red y tricrómico de Masson	173
3.4. Detección de macrófagos positivos F4/80 por inmunohistoquímica	174
<b>4- Estudios <i>in vitro</i></b>	175
4.1. Aislamiento y cultivo primario de hepatocitos	175
4.2. Experimentos <i>ex vivo</i> de preparaciones organotípicas de tejido hepático fresco / cortes de alta precisión de hígado de ratón	178
4.3. Protocolo de inducción de esteatosis hepática <i>in vitro</i>	181
4.3. Tinción por Oil Red-O en hepatocitos primarios y en cultivos organotípicos de hígado	181
4.5. Modelo <i>in vitro</i> de inducción de inflamación hepática	182
4.6. Aislamiento y cultivo primario de células de Kupffer y CEH	182
4.7. Inmuntinción de macrófagos para citometria de flujo	185
4.8. Inmuntinción de PPAR $\gamma$ en células de Kupffer y CEH	186
4.9. Aislamiento y cultivo de macrófagos peritoneales	187
<b>5- Análisis de la expresión génica</b>	188
5.1. Extracción de ARN	188
5.2. PCR convencional	188
5.3. PCR a tiempo real	189
<b>6- Análisis de la expresión proteica</b>	191
6.1. Extracción de proteínas totales	191
6.2. Extracción de proteínas nucleares	191
6.3. Cuantificación de proteínas	192
6.3.1. Bradford	192
6.3.2. Micro BCA	193
6.4. Determinación de los niveles de proteína (Western blot)	193
6.5. Análisis de la actividad caspasa-3/7	197
6.6. Determinación de la actividad NF- $\kappa$ B	197
6.7. Determinación de 4-hidroxinonenal (4-HNE)	197

6.8. Contenido hidroxiprolina	198
<b>7- Análisis estadístico</b>	<b>198</b>
<b>ANEXO III: Otras publicaciones</b>	<b>199</b>
<b>ANEXO IV: Presentaciones en congresos</b>	<b>203</b>



## Índice de figuras

Figura 1. Estructura del lóbulo hepático	3
Figura 2. El sinusoides hepático	3
Figura 3. Activación disfuncional y alterada de las CK en la EHGNA promueve la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA)	6
Figura 4. Características fenotípicas y funcionales en la activación de las CEH durante el daño hepático	7
Figura 5. Estadios de la EHGNA	9
Figura 6. Mecanismos de acumulación de lípidos en el hígado	12
Figura 7. Mecanismos celulares surgidos en la respuesta inflamatoria y fibrogénica del hígado	17
Figura 8. Estructura del gen de PPAR $\gamma$ murino	27
Figura 9. Estructura proteica de PPAR $\gamma$ mostrando los dominios y modificaciones covalentes	29
Figura 10. Representación esquemática de la activación transcripcional de PPAR $\gamma$	30
Figura 11. Mecanismos de control transcripcional de PPAR $\gamma$	31
Figura 12. Estructura química de ligandos representativos de PPAR $\gamma$	36
Figura 13. Funciones de PPAR $\gamma$ en el organismo	39
Figura 14. Estrategia de cruce en la generación de ratones KO condicionales específicos de célula	43
Figura 15. Mecanismos de acción de las TZDs	52

## Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación del tipo de lesión histopatológica en los estadios de la EHGNA	11
Tabla 2. Modelos basados en administración de dietas para la inducción de EHGNA	21
Tabla 3. Agentes hepatotóxicos para modelos experimentales de inducción de daño hepático	24
Tabla 4. Modelos de KO condicionales de PPAR $\gamma$ específicos de célula	44



## **INTRODUCCIÓN**

---



# I. ESTRUCTURA FUNCIONAL DEL HÍGADO

El hígado juega un papel central en la síntesis, el metabolismo, la homeostasis, el almacenamiento y la redistribución de carbohidratos, proteínas y lípidos (Bechmann LP et al, J Hepatol 2012). Además, es ampliamente conocida la función principal que realiza el hígado como órgano detoxificante del cuerpo.

## 1.1- EL SINUSOIDE HEPÁTICO

El hígado se compone de lóbulos hexagonales constituidos por hepatocitos formando los sinusoides que rodean una vena central. Alrededor de los lóbulos hepáticos están las tríadas portales compuestas por la arteria hepática, vena hepática portal y el conducto biliar, ramificaciones de la arteria hepática y la vena portal se entrelazan y crean una red de sinusoides (Figura 1). El sinusoide hepático es la parte funcional pero no posee membrana basal, es discontinuo y fenestrado por lo que existe un separación entre los hepatocitos y las células sinusoidales, conocida como espacio de Disse.

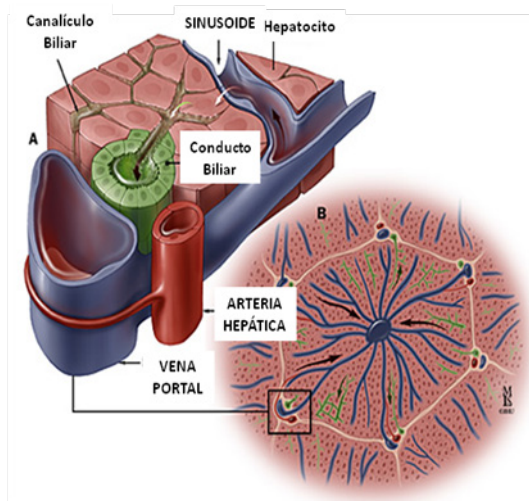


Figura 1. Estructura del lóbulo hepático. A) Área portal o tríada portal. B) Lóbulo hepático clásico (Figura adaptada de hopkins-gi.org)

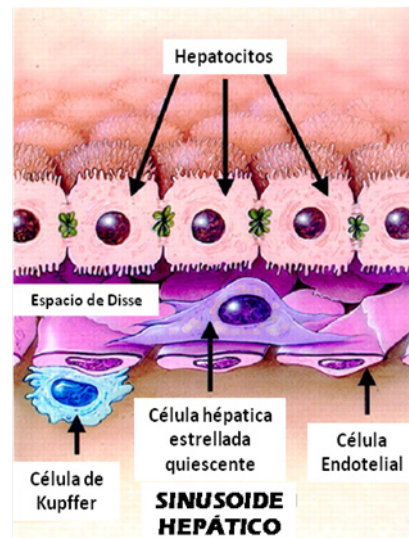


Figura 2. El sinusoide hepático (Figura adaptada de Friedman, J. Biol. Chem 2000)

Las células sinusoidales o no parenquimales constituyen el 20-30% de la población total de células del hígado y comprenden las células estrelladas hepáticas (CEH), células endoteliales del sinusoide



hepático, las células citotóxicas *pit cells* o *natural killer* (NK) y los macrófagos residentes del hígado, también conocidas como células de Kupffer (CK), mientras que las células parenquimales o hepatocitos comprenden las células restantes (**Ramadori G et al, J Physiol Pharmacol 2008, Friedman SL, JBC 2000**). Las células endoteliales constituyen el 70% de la población no parenquimal y delimitan los sinusoides hepáticos. En concreto la células endoteliales se encuentran en el lumen sinusoidal formando la pared fenestrada, de esta forma existe una comunicación fluida y permite transportar rápidamente sustancias entre el lumen sinusoidal y el espacio de Disse. Las NK del hígado son <1% de las células sinusoidales y se caracterizan por ser linfocitos granulados con una gran actividad citotóxica que se localizan en el lumen sinusoidal cerca de las CK; de esta forma las CK controlan la movilidad, adherencia y citotoxicidad de las NK.

Las enfermedades hepáticas caracterizan por complejas interacciones entre las células residentes y las reclutadas, estos hechos determinan la severidad de cambios patológicos que pueden suceder en los diferentes estadios de la enfermedad del hígado graso de origen no alcohólico (EHGNA). Por ello, a continuación se describen las características y funciones realizadas por las células del hígado que participan más activamente en las diferentes etapas de la EHGNA.

## 1.2- HEPATOCITOS

Los hepatocitos constituyen un 70-80% del volumen celular del hígado, organizándose en sinusoides separados por canales de vasculatura y conductos biliares. Los hepatocitos se caracterizan por presentar un gran número de ribosomas en el citoplasma eosinófilo, punteado por numerosos retículos endoplasmáticos y ribosomas. Realizan abundantes funciones biológicas como la síntesis y depósito de proteínas, transformación de carbohidratos, síntesis de colesterol, sales biliares y fosfolípidos. Así mismo están involucrados en procesos de detoxificación, modificación y excreción de sustancias endógenas y exógenas. Los hepatocitos son capaces de sintetizar hormonas (factor de crecimiento de insulínico tipo 1, IGF-1; eritropoietina; etc),

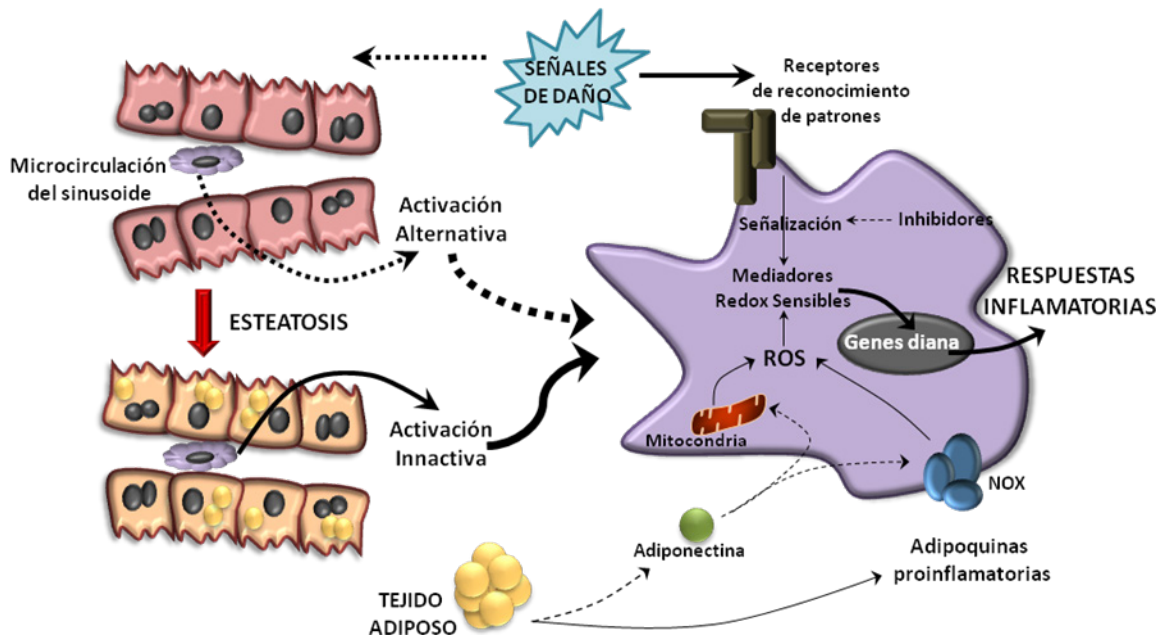
citoquinas (interleuquina-6, IL-6; interleuquina-8, IL-8) y quimiocinas (quimiocina C-X-C ligando 1, CXCL1 o KC/Gro; proteína inducible por Interferon gamma, IP-10 o CXCL10; proteínas inflamatorias de macrófagos, MIPs o CCL3/CCL4), por lo que inician la respuesta inflamatoria y activan las CK. Aunque la respuesta frente al daño suscitado puede provocar el estrés y muerte del hepatocito, la vida media del hepatocito es de 5 meses con la capacidad de regenerarse (**Ramadori G et al, J Physiol Pharmacol 2008**).

### **1.3- CÉLULAS DE KUPFFER (CK)**

Las CK derivan de los monocitos circulantes derivados de las células progenitoras de la médula ósea por lo que forman parte de la línea mieloide. Representan un 10% de la población total de células del hígado, en concreto constituyen el 20% de la fracción de células no parenquimales. Las CK se encuentran estratégicamente localizadas en el lumen sinusoidal adheridas a las células endoteliales. De esta forma las CK pueden estar en contacto con variedad de sustancias moleculares y pueden migrar a través de los sinusoides y el espacio de Disse orquestando la comunicación entre las células residentes y las reclutadas. Las CK participan ampliamente frente las respuestas patológicas originadas en enfermedades del hígado como las hepatitis víricas, colestasis intrahepáticas, activación o rechazo del hígado durante el trasplante hepático, esteatohepatitis alcohólica o la EHGNA.

Las CK pueden especializarse realizando diversas funciones como la presentación o procesamiento de antígenos, fagocitosis y secreción de mediadores proinflamatorios. Los productos generados por las CK incluyen citoquinas (interleuquina-1, IL-1; IL-6; IL-8; factor de necrosis tumoral- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ; etc), quimiocinas (familia C-X-C: IP-109, KC/Gro o familia C-C: MCP-1, RANTES, etc), eicosanoides, óxido nítrico o especies reactivas del oxígeno (ROS). La variedad de mediadores biológicos que liberan las CK inducen una respuesta inflamatoria al daño hepático e inician interacciones para reclutar células extrahepáticas (neutrófilos, linfocitos T, NK y monocitos circulantes) e influenciar los fenotipos de células vecinas como los hepatocitos, CEH y células endoteliales. La activación de

la respuesta proinflamatoria en las CK afecta en la aparición de resistencia a la insulina (RI) hepática en la obesidad. Además, las funciones que realizan las CK y las alteraciones de las mismas confieren responsabilidad a las CK en la patogénesis de la EHGNA como por ejemplo: fallo en el reconocimiento y eliminación de moléculas dañinas, excesiva activación de mecanismos citotóxicos (ROS, citoquinas, etc), inhabilidad por los hepatocitos esteatóticos de promover la activación alternativa en las CK característica de los macrófagos des de el fenotipo clásicamente activado M1 hacia el estado antiinflamatorio del fenotipo alternativamente activado M2, o la incapacidad de las CK de interrumpir la respuesta inflamatoria exacerbada (**Figura 2**). Estudios recientes apuntan hacia una importante intercomunicación entre los hepatocitos y las CK en la regulación del metabolismo lipídico en el contexto de la EHGNA, pero el impacto que realizan las CK depende del estado de inflamación y activación (polarización M1/M2) en que se encuentren (**Baffy G, J Hepatol 2009; Bilzer M et al, Liver Int 2006; Zhan YT y An W, World J Gastro 2010; Friedman SL, JBC 2000**).



**Figura 3. Activación disfuncional y alterada de las CK en la EHGNA promueve la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA).** Las señales de daño recibidas a través de la vía portal no son reconocidas correctamente por las receptores. De esta forma se alteran rutas de señalización (sobreactivación y fallo en la inhibición) por lo que se intensifican las respuestas generadas por las CK (ROS, citoquinas,..). La influencia de las adipocinas generadas por el tejido adiposo en la generación de ROS y la activación de las células inflamatorias debido a la anormal morfología en los hepatocitos por la acumulación de grasa también frena la activación alternativa de las CK (Figura adaptada de Baffy, J Hepatol 2009).

#### 1.4-CÉLULA ESTRELLADA HEPÁTICA (CEH)

En un estado normal las CEH mantienen un estado de quiescencia y almacenan grandes cantidades de vitamina A (retinoides, en concreto retinol y retinil ésters), triglicéridos (TG) y ésteres de colesterol. Las CEH se localizan en el espacio de Disse entre los hepatocitos y las células endoteliales del sinusoides hepático. Cuando el hígado sufre un daño, las CEH se activan y experimentan una transdiferenciación hacia el fenotipo de miofibroblasto. La influencia de un estado inflamatorio y las interacciones con células presentes en respuesta a la inflamación (como las CK, NK o células B y T) promueven la activación de las CEH. El proceso de activación de las CEH se considera un fenómeno crucial para la respuesta fibrogénica ya que es la principal fuente de producción de matriz extracelular (MEC) además de secretar quimocinas (MCP-1, CCL21 o RANTES) que amplifican las respuesta inflamatoria. La activación de la CEH conlleva la pérdida de vitamina A, el aumento de la capacidad de proliferación y cambios en su perfil de expresión génica. Las CEH activadas sufren cambios fenotípicos ya que adquieren propiedades de contracción, quimotaxis, producen inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMP) e incrementan la secreción de las proteínas alfa actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), colágeno tipo I y III. Por lo que las CEH ejercen un papel central en la patogénesis de la EHNA al actuar de inmunoreguladores en las etapas iniciales de la fibrosis hepática (Friedman SL, JBC 2000; Trauner M et al, BBA 2010; Beaven VR et al, Gastroenterology 2011).

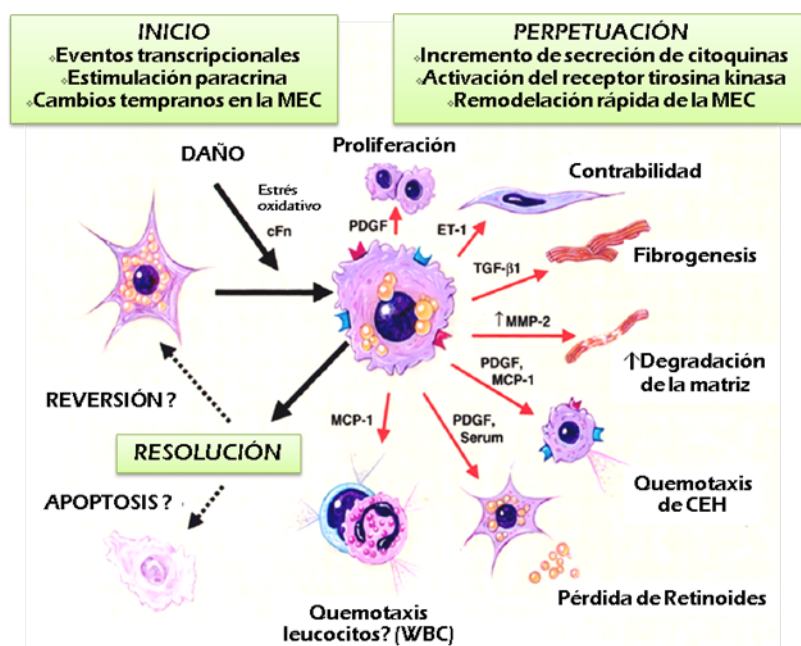


Figura 4. Características fenotípicas y funcionales en la activación de las CEH durante el daño hepático (Figura adaptada de Friedman SL, JBC 2000)

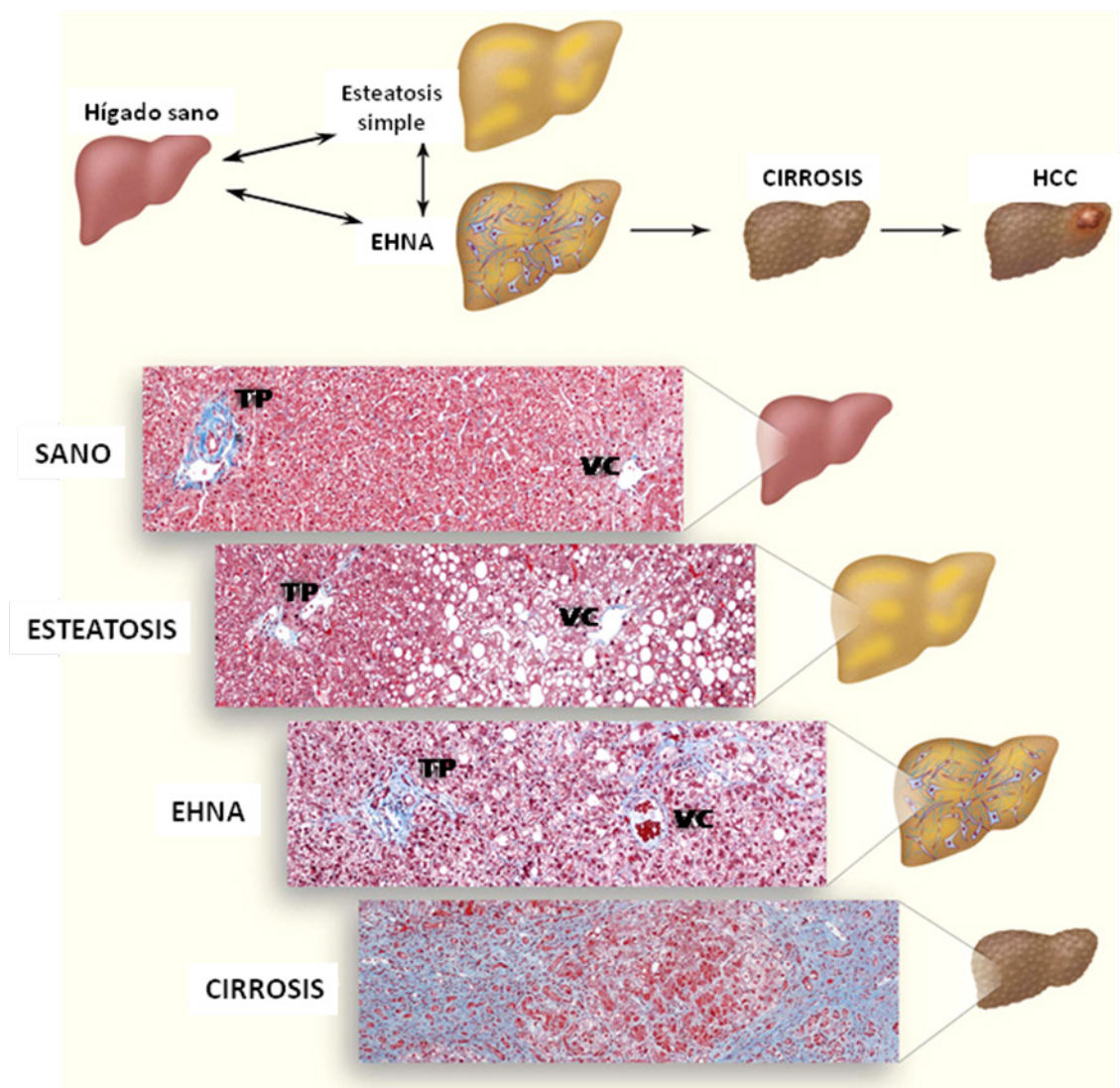
## II- LA ENFERMEDAD DEL HÍGADO GRASO DE ORIGEN NO ALCOHÓLICO (EHGNA)

No fue hasta 1980 cuando Ludwig y colaboradores describieron la EHGNA en muestras histológicas de hígados de pacientes que presentaban una característica en común: la ausencia de consumo excesivo de alcohol en el historial clínico (**Ludwig J et al, Mayo Clin Proc. 1980**). La EHGNA es un problema de salud surgido a raíz de los cambios alimentarios en la población y la tendencia hacia una dieta poco saludable. Por ello, se considera la manifestación hepática del síndrome metabólico, por lo que múltiples estudios asocian el desarrollo de la EHGNA con características clínicas como sobrepeso y obesidad, resistencia a la insulina, diabetes mellitus (DM) tipo II, hipertensión y dislipidemia.

La EHGNA es una enfermedad crónica que comprende diferentes estadios patológicos (**Figura 5**). La etapa más temprana es la esteatosis hepática; consiste en la acumulación de TG en forma de vacuolas lipídicas en el citoplasma de los hepatocitos. La esteatosis hepática puede ser limitada pero puede progresar a EHNA. La EHNA se diferencia de la esteatosis hepática simple debido a la presencia de infiltrado inflamatorio y lesión en el hepatocito (degeneración hidrópica o balonización y muerte celular). Basado en datos clínicos y experimentales, el año 1998 se propuso el modelo tradicional del “doble impacto” que explica las causas del desarrollo y progresión de la EHGNA, desde la esteatosis hepática simple hacia la EHNA (**Day C et al, Gastroenterology, 1998**). Hipótesis alternativas están ganando fuerza como la “hipótesis de los hits paralelos múltiples” propuesta por L. Tilg y J. Moschen. Esta hipótesis considera que la EHGNA y la EHNA pueden representar diferentes estados de enfermedad ya que en ciertas circunstancias la inflamación puede anteponerse a la esteatosis (**Tilg L et al, Hepatology, 2011**). Pero recientemente L. Hebbard y J. George han sugerido el modelo de respuesta integrado basado en resultados obtenidos de modelos animales en los que sugieren que la formación del hígado graso y la esteatohepatitis a menudo se desarrollan simultáneamente a través de “múltiples hits interrelacionados” (**Hebbard L y George J, Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2011**). Tras la instauración de la EHNA, los pacientes



pueden desarrollar fibrosis, que a su vez puede progresar a cirrosis. En la cirrosis, los hepatocitos son reemplazados por tejido cicatrizado formado principalmente por colágeno tipo I (el cual es secretado principalmente por las CEH tras su activación) y se produce pérdida de la estructura parenquimal además de alterar la funcionalidad del hígado. La cirrosis puede progresar en último término a hepatocarcinoma (HCC) o fallo hepático (Angulo P, N Engl J Med 2002; Cohen JC et al, Science 2012).



**Figura 5. Estadios de la EHGNA.** La esteatosis simple, la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), la cirrosis y el hepatocarcinoma (HCC). Secciones histológicas de hígado humano teñidas con tricrómico de Masson para detectar las fibras de colágeno. VC: vena central y TP: triada portal constituida por arteria hepática, vena portal y conducto biliar. (Figura adaptada de Cohen JC et al, Science 2011)

## 2.1- PREVALENCIA / EPIDEMIOLOGIA

Se ha estimado que un 14-24% de población en general sufre la EHGNA, y actualmente también se ha extendido ampliamente entre la población infantil. De hecho, existe una prevalencia del 30-100% de obesidad entre los pacientes con EHGNA, mientras que un 10-75% padece DM tipo II y entre el 20-92% sufre hiperlipidemia (**Angulo P, N Engl J Med 2002; Fujii HJ et al, Gastroenterology 2012**). La esteatosis hepática se considera una etapa benigna, pero la presencia de inflamación hepática promueve el desarrollo de fibrosis y cirrosis. Debido al aumento de EHGNA, también se considera la esteatohepatitis una enfermedad emergente en países desarrollados. Entre 10–25% de pacientes con EHGNA desarrollan EHNA por lo que afecta aproximadamente el 1-2% de la población occidental, siendo la tercera pauta más común de trasplante hepático en Estados Unidos (**Angulo P, N Engl J Med. 2002; Fujii H et al, J Gastroenterol 2012; Charlton MR et al, Gastroenterology 2011**). Estudios retrospectivos indican que un 38-50% de pacientes con EHGNA progresan hacia fibrosis hepática en un intervalo de 5,3 años, 15% cirrosis y 3% progresan hasta el fallo hepático terminal (**Fujii H, J Gastroenterol 2012**). Por otro lado, la progresión de la EHGNA hacia la EHNA y la cirrosis es diferente entre grupos étnicos contrastados (**Browning JD et al, JCI 2004; Cohen JC et al, Science 2012**).

## 2.2- MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La esteatosis hepática puede ser diagnosticada de forma no invasiva, pero la prueba de referencia es la biopsia hepática ya que puede discernir entre EHGNA y EHNA. Además de mostrar la acumulación de grasa en los hepatocitos, la biopsia hepática puede determinar los diversos grados de inflamación y fibrosis. El procedimiento se realiza a individuos que presenten RI y/o niveles circulantes elevados de transaminasas (las enzimas alanino aminotransferas [ALT], aspartato aminotransferasa [AST] o la gammaglutamil transpeptidasa [GGT]) (**Angulo P, N Engl J Med 2002; Cohen JC et al, Science 2012**).

## 2.3- EVIDENCIAS HISTOLÓGICAS

La EHGNA es histológicamente indistinguible del daño hepático originado por el abuso de alcohol, por ese motivo Brunt y colaboradores propusieron una clasificación histológica para evaluar la esteatosis, su distribución e intensidad, los estadios del daño hepático en la EHNA, así como en la fibrosis hepática (**Figura 5 y Tabla 1**).

**Tabla 1. Clasificación del tipo de lesión histopatológica en los estadios de la EHGNA (adaptada de Brunt et al, Am J Gastroenterol 1999)**

### **Esteatosis hepática**

Grado 1: <33% de hepatocitos afectados

Grado 2: 33-66% de hepatocitos afectados

Grado 3: >66% de hepatocitos afectados

### **Esteatohepatitis (EHNA)**

Grado 1, Leve

Steatosis: microvesicular, afecta el 66% de los lobulos

Degeneración hidrópica: ocasionalmente en los hepatocitos perivenular o centrilobular

Inflamación lobular: inflamación escasa, aguda (células polimorfonucleares) y crónica (células mononucleares)

Inflamación portal: nula o leve

Grado 2, Moderada

Steatosis: cualquier grado, mezcla de esteatosis microvesicular y macrovesicular

Degeneración hidrópica: visible, presente en la zona centrilobular

Inflamación lobular: las células polimorfonucleares se encuentran asociadas con hepatocitos que presentan degeneración hidrópica

Inflamación portal: leve a moderada, se puede observar fibrosis pericelular con inflamación crónica leve

Grado 3, Severa (esteatohepatitis evidente)

Steatosis: >66% de lóbulos

Degeneración hidrópica: marcada y predominante en la zona centrilobular

Inflamación lobular: inflamación escasa aguda y crónica, las células polimorfonucleares concentradas en la zona perivenular en las áreas de degeneración hidrópica y fibrosis perisinusoidal

Inflamación portal: leve a moderada

### **Fibrosis hepática**

Estadio 1: fibrosis en la zona perivenular, perisinusoidal o pericelular, focal o extensa

Estadio 2: estadio 1 con fibrosis portal, focal o extensa

Estadio 3: fibrosis con puentes, focal o extensa

Estadio 4: cirrosis con o sin fibrosis peridinusoidal residual

## 2.4- ETIOPATOGENIA DE LA EHGNA

Los principales lípidos almacenados en el hígado de pacientes con EHGNA son los TG. El primer estadio de la EHGNA se origina por el desequilibrio y trastorno que se produce en los mecanismos de síntesis, captación, transporte y eliminación de TG. Además, la RI juega un papel

fisiopatológico crucial en el desarrollo y la progresión de la EHGNA. Defectos o alteraciones en el balance fisiológico de alguna de las siguientes vías conduce a la esteatosis hepática (Figura 6):

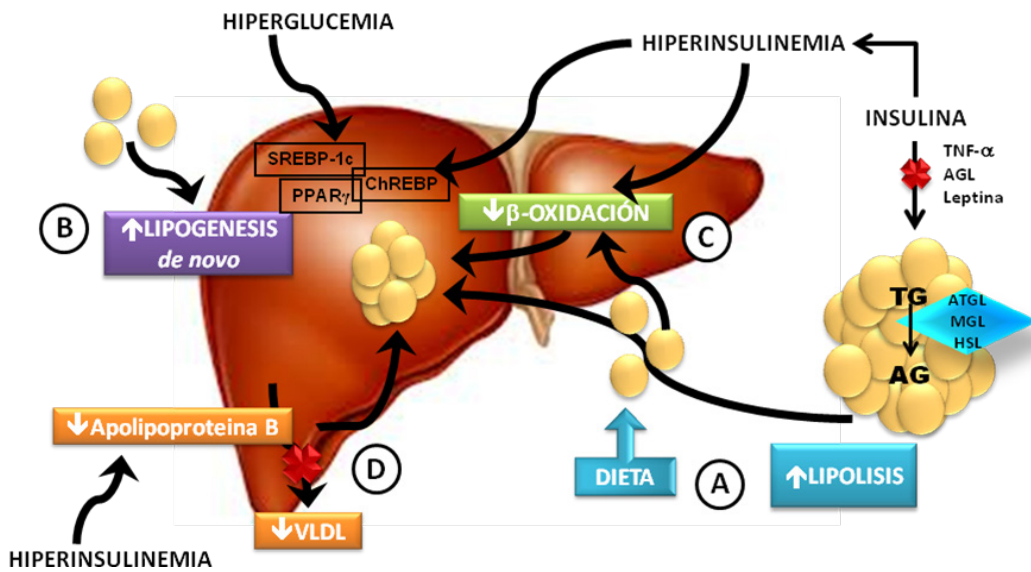


Figura 6. Mecanismos de acumulación de lípidos en el hígado. TG: triglicéridos y AGL: ácidos grasos libres (Figura adaptada de Trauner, BBA 2010; Angulo P, N Engl J Med 2002)

**A) Incremento de la captación de ácidos grasos libres (AGL) debido al aumento de lipólisis del tejido adiposo subcutáneo o visceral y al incremento de consumo de grasa procedente de la dieta.**

La entrada de ácidos grasos (AG) en el hígado depende de la cantidad y la capacidad de transporte. Durante el periodo de post-absorción, el tejido adiposo subcutáneo y visceral libera la mayor fuente de AGL en la circulación debido a la activación de la lipasa de triglicéridos adipocitaria (ATGL), enzima que interviene en la primera etapa de hidrólisis de TG. Durante la obesidad o el síndrome metabólico, la presencia de mediadores inflamatorios y el aumento de AGL circulantes procedentes de la grasa de la dieta y del ascenso en la lipólisis regulan la acción de la insulina y la manifestación de la EHGNA. Las vías de señalización donde participa la insulina juegan un papel importante en la regulación del metabolismo de los AG ya que existe una estrecha relación entre el metabolismo glucídico y lipídico. La velocidad de lipólisis en el tejido adiposo periférico aumenta en un estado de RI. En la obesidad, el tejido adiposo secreta TNF- $\alpha$

que actúa de forma paracrina y autocrina activando la proteína quinasa inhibidora del factor nuclear  $\kappa$ - $\beta$  (IKK- $\beta$ ) y activando la fosforilación de los receptores de insulina (IRS1 y IRS2). De esta forma fracasa la supresión que realizaría la insulina sobre la lipasa sensible a hormonas (HSL). Por lo tanto, la activación continuada de HSL contribuye al aumento de AGL en plasma así como de su llegada al hígado (Smith BW et al, Crit Rev Clin Lab Sci, 2011; Anstee QM y Goldin RD, Int J Exp Path 2006).

### **B) Aumento de la lipogénesis hepática o síntesis *de novo* de TG.**

La síntesis de TG se realiza a partir de AG procedentes de 3 fuentes: la dieta, la lipogénesis *de novo* y el tejido adiposo. La síntesis *de novo* de lípidos incluye la síntesis de AG a partir de acetil-CoA y malonil-CoA, y es catalizada por la acetil-CoA carboxilasa (ACC) y la sintasa de AG (FAS) reguladas de forma compleja por varios receptores nucleares que actúan como factores de transcripción. La lipogénesis *de novo* de AG en el hígado se regula de forma independiente de la insulina y la glucosa, pero los vínculos de unión entre el metabolismo lipídico y glucídico son los receptores nucleares ya que son mediadores importantes de las vías de señalización de la insulina. Los factores de transcripción lipogénicos regulados tanto por la glucosa como por la insulina controlan la síntesis *de novo* en el hígado, de esta forma la hiperinsulinemia y la hiperglucemia producidas por la RI regulan al alza la síntesis de TG. La insulina estimula el factor de transcripción “proteína 1c de unión al elemento de respuesta a los esteroides” (SREBP-1c) a través de la cascada de señalización donde participan AKT2, LXR, y mTOR. En consecuencia, SREBP-1c activa transcripcionalmente la expresión de las enzimas que catalizan la lipogénesis. La glucosa también promueve la lipogénesis activando el factor de transcripción “proteína de unión al elemento de respuesta a los carbohidratos” (ChREBP). ChREBP incrementa la expresión de la piruvato quinasa del hígado (L-PK), una enzima clave en la regulación de la glicólisis ya que cataliza la producción de piruvato el cual entra en el ciclo de Krebs para generar acetil-CoA. Tanto SREBP-1c como ChREBP inducen sinérgicamente la expresión de ACC y FAS, por lo que proporcionan más sustrato para la síntesis de AG y TG. La ACC se encarga de convertir el acetil-

CoA surgido del ciclo de Krebs e incrementa los niveles de malonil-CoA. Malonil-CoA es incorporado a la lipogénesis *de novo* para formar ácido palmítico (C16:0, lípido saturado de 16 carbonos) a través de la FAS. Posteriormente, el ácido palmítico puede ser desaturado por la esteroil-Coenzima A desaturasa 1 (SCD1) a ácido palmitoleico (C16:1) o elongado para formar ácido esteárico (C18:0). Estudios en humanos y ratones con esteatosis hepática muestran un exceso en la acumulación de ácido oleico (C18:1), el producto final resultante de la lipogénesis *de novo* (Browning JD et al, JCI 2004; Bechmann LP et al, J Hepatol 2012; Smith BW et al, Crit Rev Clin Lab Sci, 2011; Cohen JC et al, Science 2012). El tercer factor de transcripción que participa en el desarrollo de la esteatosis hepática es el “receptor gamma activado por proliferadores de peroxisomas” (PPAR $\gamma$ ). Estudios experimentales en modelos animales que presentaban RI e hígado graso mostraban un aumento marcado de la expresión de PPAR $\gamma$ . Además publicaciones previas han demostrado que SREBP-1c puede activar transcripcionalmente PPAR $\gamma$  a través de la producción de AG poliinsaturados (PUFA) por ser ligandos naturales de PPAR $\gamma$  (Browning JD et al, JCI 2004; Vidal-Puig AJ et al, J Clin Invest 1997; Bedoucha M et al, J Hepatol 2001; Rahimian R et al, Mol Cell Biochem 2001). La importancia del receptor PPAR $\gamma$  en el desarrollo del hígado graso se ha demostrado a través del desarrollo de dos modelos murinos con RI y la eliminación específica de PPAR $\gamma$  en el hígado ya que provocó una disminución acentuada de la esteatosis hepática de forma independiente a la presencia de hiperinsulinemia o hiperglicemia. Los mecanismos de actuación de PPAR $\gamma$  descritos a raíz del desarrollo y estudio de modelos de ratones *knockout* (KO) condicionales para este receptor en diversos tejidos se describen en el apartado 5 (Gravrilova O et al, JBC 2003; Matsusue K et al, JCI 2003).

### **C) Descenso en la oxidación de AG.**

Los AG en el hígado tienen tres destinos principales: pueden ser rápidamente oxidados en la mitocondria para generar cuerpos cetónicos y energía en forma de ATP, pueden ser esterificados produciendo TG que son almacenados en cuerpos lipídicos o unidos a apolipoproteínas para ser secretados (como la ApoB), y también pueden ser exportados hacia otros tejidos a través del

torrente sanguíneo en forma de Lipoproteína de muy baja densidad (VLDL). El incremento de la captación de AG por los hepatocitos conlleva la sobrecarga de la  $\beta$ -oxidación mitocondrial y la subsecuente acumulación de AG en el hígado. Por otra parte, la hiperinsulinemia resultante de la RI actúa de mediador en la inhibición de la oxidación lipídica al activar el factor de transcripción SREBP-1c, el cual a su vez incrementa los niveles de malonil-CoA. De esta forma, la lipogénesis *de novo* también promueve la inhibición de la oxidación de AG ya que malonil-CoA actúa de inhibidor alostérico de la carnitina palmitoltransferasa-1 (CPT-I), responsable del transporte a través de la membrana mitocondrial de los AG de cadena larga (**Browning JD et al, JCI 2004; Bechmann LP et al, J Hepatol 2012**).

#### **D) Descenso de la secreción hepática de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL).**

Estudios con isótopos marcados han demostrado que los AGL circulantes derivados de la lipólisis en el tejido adiposo representan un 60% de los TG hepáticos en pacientes con la EHGNA, un 25% representan los TG generados en la lipogénesis *de novo* y el 15% procede de la dieta (**Donnelly KL et al, JCI 2005**). De esta forma se determinó que los AGL, la lipólisis y la lipogénesis ejercen una mayor contribución en el desarrollo de la esteatosis hepática de la EHGNA, mientras que la ausencia de oxidación de AG o secreción de VLDL contribuyen en menor medida.

Otros factores recientemente descritos que pueden contribuir al aumento de carga intracelular de AG son: la interrupción de la degradación de los autofagosomas formados por la unión de cuerpos lipídicos con lisosomas, conjuntamente con alteraciones en la expresión de transportadores de AG (FATP) y proteínas de unión a AG (FABP) que determinan el flujo y la concentración de AG en el hígado (**Bechmann LP et al, J Hepatol 2012; Trauner M et al, BBA 2010**).

En resumen, la esteatosis hepática ocurre en los hepatocitos cuando el ratio de captación o síntesis de AG supera el ratio de exportación o del catabolismo de TG. La exposición crónica del hígado a elevadas concentraciones de AG, TG y colesterol desencadena efectos tóxicos que contribuyen a la patogénesis de la RI, DM tipo II y el síndrome metabólico. Aunque evidencias

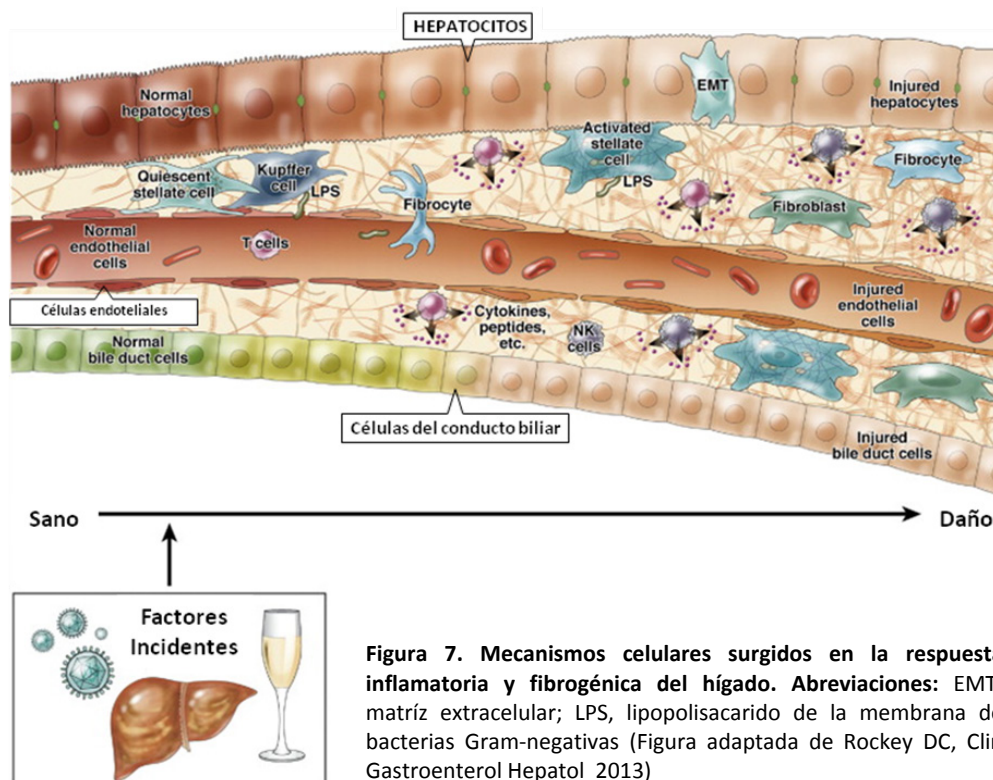


recientes sugieren que la acumulación de TG no sólo puede verse como una patología, sino que puede ofrecer función protectora además de ser una respuesta fisiológica a un exceso de consumo calórico. De hecho, modelos animales publicados con la sobreexpresión de la enzima diacilglicerol aciltransferasa 1 (DGAT1, responsable de catalizar la última etapa en la síntesis de TG) muestran obesidad e hígado graso pero una mayor protección frente a la activación de los macrófagos, inflamación sistémica y RI (**Koliwad SK et al, JCI 2010**). Igualmente, se ha postulado que la síntesis de TG es una respuesta adaptativa y beneficiosa cuando los hepatocitos están expuestos a metabolitos lipídicos potencialmente tóxicos (**Tilg H et al, Hepatology, 2010**). Aún así, la esteatosis hepática generalmente genera lipotoxicidad y está ampliamente relacionada con la obesidad y la RI, una tríada de características que promueven la respuesta inflamatoria y la progresión hacia la EHNA. De hecho, aunque los AGL se identifican como las causas potenciales de lipotoxicidad, tanto la acumulación de TG como la formación de cuerpos lipídicos también son factores claves para la progresión de la enfermedad. En conjunto AGL, TG hepáticos y cuerpos lipídicos alteran la señalización hepática de la insulina resultando en RI, inducen muerte hepatocelular, favorecen la activación de las CK y la respuesta inflamatoria, y activan la respuesta fibrogénica de la CEH (**Bechmann LP et al, J Heptol 2012; Trauner M et al, BBA 2010**).

## **2.5- INFLAMACIÓN HEPÁTICA Y LAS ENFERMEDADES ASOCIADAS**

El daño hepatocelular puede originarse por múltiples factores como el alcohol, virus, enfermedades autoinmunes, colestasis crónica, defectos genéticos o alteraciones metabólicas pero caracterizados por diferentes eventos patológicos según el agente etiológico. La respuesta inflamatoria en el hígado surge tras cualquier agresión provocada por agentes externos químicos, físicos o biológicos que alteran la homeostasis. La lesión tisular hepática desencadena un proceso de inflamación aguda que conduce principalmente a la muerte de los hepatocitos y la remodelación de la MEC restableciendo la arquitectura normal del hígado. En el momento que el daño actúa de forma crónica y los efectos sobrepasan la capacidad de defensa se produce una

respuesta inflamatoria prolongada caracterizada por una regeneración incontrolada (degradación insuficiente de una excesiva síntesis de matriz) (**Figura 7**).



### 2.5.1. Factores implicados en la progresión de la EHNA

En el primer estadio de la EHNA la acumulación continuada y en exceso de TG en el citoplasma de los hepatocitos incrementa la sensibilidad y vulnerabilidad del hígado frente a un conjunto de factores originando inflamación y daño en el hepatocito (EHNA) pudiendo progresar a fibrosis hepática.

Los mecanismos implicados en el desarrollo de la EHNA son la activación de las CK junto con el reclutamiento de células inflamatorias (neutrófilos, leucocitos y monocitos), la generación de ROS causando estrés oxidativo y peroxidación lipídica, la respuesta generada por el estrés del retículo endoplasmático (RE), la liberación de derivados del ácido araquidónico, y la producción de citoquinas como IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  o el factor de crecimiento tisular  $\beta$  (TGF $\beta$ ), así como la RI (**Figura 7**) (**Angulo P, N Engl J Med 2002; Browning JD et al, JCI 2004; Cortez-Pinto H et al, J Hepatol 2006; Clària J et al, Gastroenterol Hepato 2008**).

### **Estrés oxidativo y peroxidación lipídica**

La formación de ROS por macrófagos y células inflamatorias así como alteraciones entre los niveles de especies pro- o anti-oxidantes provoca daño en el ADN, alteraciones en la estabilidad de las proteínas y destrucción de membranas a través de la peroxidación lipídica. La oxidación de los AG hepáticos por los peroxisomas, las mitocondrias o el sistema citocromo P450, incrementa la fuente de producción de ROS. En concreto, la peroxidación de los ácidos grasos PUFA produce los aldehídos 4-hidroxinonenal (HNE) y malondialdehído (MDA) que pueden unirse a las proteínas hepáticas formando aductos capaces de potenciar la respuesta inmune, estimular la síntesis de MEC a través las CEH, estimular la quimiotaxis de los neutrófilos, y unirse a las citoqueratinas y crear los cuerpos de Mallory. La peroxidación lipídica de las membranas plasmática y mitocondrial produce la liberación de citoquinas, de moléculas de adhesión y pueden causar la aparición de megamitocondrias además de la muerte hepatocitaria, por apoptosis o necrosis (**Browning JD et al, JCI 2004; Cortez-Pinto H et al, J Hepatol 2006**).

### **Estrés del RE**

Los depósitos de AGL en los hepatocitos desencadena el estrés de la membrana del RE que se manifiesta por la acumulación de proteínas no acopladas, la activación del proceso reparador de “respuesta a proteínas no acoplada” (conocido como UPR) y el incremento de expresión de factores de transcripción y quinasas. El estrés en el RE activa la expresión de SREBP-1c, la quinasa JNK y genes proapoptóticos como la caspasa 12 provocando una respuesta caracterizada por el incremento en la síntesis de lípidos, apoptosis y RI (debido a la inducción de JNK), todos ellos mecanismos que se producen en la EHGNA (**Cortez-Pinto H et al, J Hepatol 2006; Smith BW et al, Crit Rev Clin Lab Sci 2011**).

### **Citoquinas**

Las citoquinas ejercen un papel central en la progresión de la EHGNA ya que son capaces de proactivar los sucesos que caracterizan la EHNA participando en la muerte del hepatocito (TNF- $\alpha$ ,

TGF- $\beta$ ), quimotaxis de los neutrófilos (IL-8), activación de las CEH (TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ ), formación de los cuerpos de Mallory (TGF- $\beta$ ) y en la RI hepática y sistémica asociada a la EHNA (TNF- $\alpha$ , IL-6 y IL-1 $\beta$ ). TNF- $\alpha$  se considera una de las citoquinas principales relacionadas con el daño hepático, además de ser secretada por las CK, los AG intrahepáticos en la esteatosis hepática promueven el incremento de expresión de TNF- $\alpha$  de forma dependiente de NF- $\kappa$ B. En la obesidad, los macrófagos activados del tejido adiposo así como los adipocitos estresados secretan elevadas cantidades de TNF- $\alpha$ . En situaciones de estrés oxidativo se induce la muerte hepatocitaria principalmente a través de la expresión de TNF- $\alpha$  que al interactuar con su receptor (TNF-R1) activa la vía de señalización de caspasa 8 (Bataller R et al, JCI 2005; Cortez-Pinto H et al, J Hepatol 2006).

### **Resistencia a la insulina**

Estudios realizados en modelos murinos y en humanos demuestran una clara asociación entre la obesidad, la esteatosis y la RI. La RI se caracteriza por la disminución de la entrada de glucosa en los tejidos periféricos (músculo, tejido adiposo) debido a alteraciones en las respuestas hacia la insulina (Pagano G et al, Hepatology 2002; Tilg H et al, Trends Endocrinol Metab 2008). En la secuencia patológica de la EHGNA, la esteatosis hepática antecede la RI hepática ya que la acumulación de grasa es suficiente para activar mecanismos involucrados como la quinasa JNK, la proteína C-3 (PKC-3), I $\kappa$ K- $\beta$  y NF- $\kappa$ B (Browning JD et al, JCI 2004; Cortez-Pinto H et al, J Hepatol 2006; Tilg H et al, Trends Endocrinol Metab 2008; Ogawa W et al, Science 2008).

### **2.5.2. Fibrosis hepática**

Los estímulos iniciados por la activación de los hepatocitos, las células endoteliales y las CK como consecuencia de la respuesta inflamatoria crónica, causan alteraciones en la regeneración hepática y los hepatocitos son sustituidos por MEC. El estrés oxidativo y la activación de las CK junto con la liberación de PDGF, TNF- $\alpha$ , leptina, angiotensina II i TGF- $\beta$  activan las CEH. Las CEH

pasan de un estado de quiescencia a adquirir un fenotipo parecido al miofibroblasto con capacidad de contracción, proliferación, inflamación y fibrogénesis por lo que se acumulan en zonas de muerte hepatocitaria y secretan citoquinas proinflamatorias además de proteínas de la MEC. **(Figura 4 y Figura 7)** De hecho el factor TGF- $\beta$  liberado por las CK suscita la secreción de colágeno I por las CEH y la inhibición de la degradación de la nueva MEC al inducir las proteínas TIMP **(Friedman SL, JBC 2000; Bataller R et al, JCI 2005; Iredale JP, JCI 2007)**

## **2.6- INFLUENCIA DEL TEJIDO ADIPOSO SOBRE LAS ENFERMEDADES HEPÁTICAS**

El tejido adiposo es el órgano endocrino más grande del cuerpo y produce una gran cantidad de hormonas activas conocidas como adipoquinas. En el contexto de la enfermedad hepática la obesidad acompaña en muchos casos la EHGNA. El tejido adiposo en un estado de estrés e inflamación crónica incrementa la lipólisis que provoca el aumento de AGL circulantes hacia el hígado, además de afectarlo de forma paracrina debido a la secreción de adipoquinas proinflamatorias como: TNF- $\alpha$  i IL-6, la leptina (asociada a la activación de la CEH y la fibrogénesis), la resistina (encargada de antagonizar los efectos de la insulina en el hígado y aumentar los niveles de glucosa) y la reducción en la secreción de adiponectina (que mejora la sensibilidad a la insulina ejerciendo efectos hepatoprotectores y antifibrogénicos). Al mismo tiempo, en el tejido adiposo se produce un incremento del número y estado de activación del infiltrado de macrófagos (con un fenotipo clásicamente activado conocido como M1), por lo que potencian aún más la inflamación y contribuyen en la patogénesis de la EHGNA en términos de inducir o incrementar la RI **(Angulo P, N Engl J Med 2002; Cortez-Pinto H et al, J Hepatol 2006; Ogawa W et al, Science 2008; Rius et al, Front Immunol 2012).**

## 2.7- MODELOS EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DE LA EHGNA Y EL DAÑO HEPÁTICO

### 2.7.1. Modelos experimentales para el estudio de la EHGNA

Aunque ningún modelo animal resume todo el espectro de características clínicas de la EHGNA humana, los modelos experimentales son de utilidad al proporcionar conocimientos sobre los mecanismos que contribuyen a su progresión. Existen una variedad de modelos animales experimentales establecidos y basados en diferentes mecanismos para inducir la formación del hígado graso y/o EHNA. Se pueden clasificar los modelos experimentales de EHGNA en dos grupos: el primero incluye los modelos animales que adquieren la patología después de la administración de dietas, y el segundo incluye los animales manipulados genéticamente que desarrollan espontáneamente la enfermedad. En la **tabla 2** se muestran los diferentes modelos experimentales que se resumen a continuación.

**Tabla 2. Modelos basados en administración de dietas para la inducción de EHGNA**

Modelo	Mecanismo	RI	O	E	EH	F
<b>DMC</b>	Aumento de oxidación microsomal de lípidos, inflamación, estrés oxidativo y síntesis de lípidos. Eliminación alterada de grasas en los hepatocitos.	Hepática	Pérdida de peso	SI	SI	SI
<b>DCAA</b>	Mismos mecanismos que DMC pero en un plazo de tiempo más largo.	NO	Pérdida de peso	SI	SI	SI
<b>DRG</b>	Aumento inflamación, estrés oxidativo, lipogénesis hepática y reducción de la adiponectina.	SI	SI	SI	SI	NO
<b>Aterogénica</b>	El colesterol y el colato promueven la inflamación hepática y la expresión génica de colágeno. El colesterol induce esteatohepatitis porque sensibiliza el hígado frente TNF- $\alpha$ y la proteína de membrana Fas.	Hepática	NO	SI	SI	SI
<b>Fructosa</b>	Aumento inflamación, estrés oxidativo, lipogénesis hepática y reducción de la adiponectina	SI	NO	SI	NO	NO

Abreviaciones: DMC, dieta deficiente en metionina y colina; DCAA, deficiente en colina y limitada en L-aminoácidos; DRG, dieta rica en grasa; TNF- $\alpha$ , factor de necrosis tumoral-alpha; RI, resistencia a la insulina; O, obesidad; E, esteatosis; EH, esteatohepatitis; F, fibrosis (Tabla adaptada de Hebbard et al, Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2011).

Las dietas deficiente en metionina y colina (DMC) o deficiente en colina y limitada en L-aminoácidos (DCAA) son utilizadas como modelos experimentales de esteatosis hepática, pero se consideran buenos modelos para el estudio de la inflamación y fibrosis hepática en la EHGNA. Estas dietas son utilizadas para evaluar cambios y mecanismos involucrados en el daño hepático, la regeneración y la eliminación de grasa. Tanto la DMC como la DCAA afectan la reacción

mitocondrial de la  $\beta$ -oxidación y la producción de VLDL, así mismo la DMC induce la expresión de la isoforma CYP2E1 del citocromo. A pesar de ello, estos modelos no replican ni el fenotipo metabólico ni los mecanismos patológicos presentes en los pacientes con síndrome metabólico y EHGNA. En concreto los animales alimentados con DMC pierden peso (hasta 40% en 10 semanas), presentan niveles bajos de TG, colesterol, insulina, leptina y glucosa en suero, y mayor sensibilidad periférica a la insulina (**Anstee QM y Goldin RD, Int J Exp Path 2006; Hebbard L y George J, Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2011**). La dieta rica en grasa (DRG) es el modelo experimental que mejor reproduce el estilo de vida occidental y se considera una muy buena aproximación para el estudio del síndrome metabólico y la formación del hígado graso. Incrementar el aporte de grasa o carbohidratos en el hígado promueve la formación de esteatosis debido al incremento de la captación de lípidos y la síntesis *de novo*. Un 45 a 75 % de la ingesta calórica de los animales alimentados con DRG proviene de grasa; de esta forma la DRG induce obesidad, RI, esteatosis y daño hepático, asociado a la inducción de proteínas involucradas en la síntesis hepática de lípidos (SREBP1c, PPAR $\gamma$  o LXR). El uso de dietas aterogénicas con alto contenido de colato y colesterol también se han establecido como modelos de estudio de daño hepático y fibrosis. La combinación de DRG con alto contenido de colesterol puede replicar la fisiopatología humana de la EHNA, aunque el estado metabólico difiere ya que se ha demostrado que los ratones presentan pérdida de peso (9%), disminución del tejido graso, menor contenido de TG en suero y RI en el hígado pero mayor sensibilidad sistémica. El incremento del contenido de fructosa en la alimentación también ha sido asociado con la EHGNA y la fibrosis en humanos. Estudios en animales han demostrado que el suplementar la dieta con un 30% de fructosa promueve la formación de ROS, el crecimiento de bacterias intestinales e incrementa los niveles de TG hepáticos, originando inflamación y esteatosis hepática (**Hebbard L et al, Nat Rev 2011**).

Por otro lado, la manipulación genética de modelos animales se basa en los mecanismos involucrados en la acumulación intrahepática de lípidos, de esta forma la sobreexpresión o la represión de determinados genes se ha utilizado para investigar la función que realizan genes



específicos en la formación del hígado graso. En algunos casos los modelos alterados genéticamente se basan en la ausencia de factores generados por el tejido adiposo durante la obesidad para potenciar la inflamación en el hígado e incrementar la RI, por lo que origina la esteatosis hepática debido a la síntesis de AG y activación de la lipogénesis (algunos ejemplos de modelos animales como ob/ob, db/db, KO CD36, ratón transgénico o con la sobreexpresión de SREBP1c, doble KO adipoR1/R2, A-ZIP/F1, etc). Otros modelos animales se basan en la ausencia de proteínas que promueven las vías de señalización de inflamación originada por variedad de tejidos incluyendo el adiposo (ejemplos de modelos animales: KO IL-6, KO TNF- $\alpha$ , KO NEMO<sup>LPC</sup>, KO JNK1, etc) pero también existen modelos animales basados en la delección de genes involucrados en la patogénesis de la EHGNA (**Nagara P et al, World J Gastroenterol 2012**).

### **2.7.2. Modelo de inducción de inflamación y fibrosis hepática**

A parte de la administración de dietas aterogénicas o DMC/DCAA que pueden reproducir estadios avanzados de la EHGNA, existen varios modelos experimentales de daño hepático (**Tabla 3**). La administración de tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>) y la ligadura del conducto biliar (BDL) son los modelos más establecidos para el estudio de la inflamación y fibrosis hepática.

El daño tóxico por administración oral u intraperitoneal de tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>) induce acumulación de lípidos, daño en el hepatocito, necrosis, inflamación y origina puentes de fibrosis a partir de una dosis bisemanal (1ml/kg de peso corporal) desde 4 hasta 8 semanas en ratones; si se extiende su administración a 12 semanas puede ocasionar el desarrollo de cirrosis. Además, este modelo también permite estudiar los mecanismos de resolución y recuperación de la fibrosis hepática después de la interrupción de la dosis de CCl<sub>4</sub>. El CCl<sub>4</sub> se extiende a través de las estructuras vasculares y se concentra en el sinusoides hepático donde se metaboliza rápidamente por el citocromo P450 (concretamente la isoforma CYP2E1) generando la especie radical triclorometil (CCl<sub>3</sub><sup>•</sup>). Al reaccionar con oxígeno se forma CCl<sub>3</sub>OO<sup>•</sup> que inicia la reacción en cadena causando peroxidación lipídica y cambios en la permeabilidad de la membrana. Una de las

características de toxicidad del CCl<sub>4</sub> es la acumulación rápida de triglicéridos ya que interfiere y daña los mecanismos de secreción de triglicéridos. Los lípidos de membrana son las moléculas más dañadas por el CCl<sub>4</sub>, de hecho se han atribuido diversas hipótesis al respecto para explicar su mecanismo de acción en la membrana celular: primero, el carácter hidrofóbico de CCl<sub>4</sub> le confiere propiedades de lípido y segundo, la generación de radicales CCl<sub>3</sub><sup>•</sup> sucede cerca de la membrana (Clària J et al, *Ascites and Renal Dysfunction in Liver Disease* 1999; Iredale JP, *JCI* 2007; Pan X et al, *J Biol Chem* 2007; Hayashi H et al, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011). La BDL es un modelo experimental que estimula la proliferación de las células ovas y células del epitelio biliar causando la proliferación de los conductos biliares junto con inflamación portal y colangitis, por lo que es un modelo conveniente para el estudio de fibrosis biliar. Tanto el modelo de BDL como la administración de tioacetamida pueden inducir menor inflamación que el CCl<sub>4</sub>, por lo que se pueden utilizar en paralelo al modelo hepatotóxico del CCl<sub>4</sub> para validar la eficiencia de ciertas moléculas o modelos de KO. En el caso de la fibrosis hepática inducida de manera inmunológica por repetidas administraciones de Concaivalina A se reproducen las manifestaciones patológicas de la hepatitis crónica humana (Iredale JP, *JCI* 2007; Hayashi H et al, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011).

**Tabla 3. Agentes hepatotóxicos para modelos experimentales de inducción de daño hepático**

Agentes	Dosis	Efectos
<b>Fibrosis inducida con agentes químicos</b>		
<b>Tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>)</b>	1ml/kg de peso corporal 2 veces/semana i.p. de 4 a 12 semanas	Muerte de hepatocitos centrilobulares
<b>Tioacetamida (TAA)</b>	300 mg/l en agua de bebida o 200 mg/kg de peso corporal i.p. 2-3 veces/semana durante 12 semanas	Muerte de hepatocitos centrilobulares
<b>Dimetilnitrosamina</b>		Necrosis centrilobular, destrucción de las células endoteliales del sinusoides que conduce a coagulación
<b>Fibrosis colestática</b>		
<b>Ligadura del conducto biliar (BDL)</b>		Muerte de hepatocitos periportales
<b>Fibrosis inducida inmunológicamente</b>		
<b>Concaivalina A (Con A)</b>	20 mg/kg de peso corporal 1 vez/semana i.v. durante 20 semanas	Fibrosis centrilobular y perisinusoidal

Abreviaciones: i.p. vía intraperitoneal; i.v. vía intravenosa (Tabla adaptada de Hayashi H et al, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011).

### III- LOS REPECTORES ACTIVADOS POR PROLIFERADORES DE PEROXISOMAS (PPARs)

Los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs) constituyen una subfamilia de la superfamilia de receptores nucleares de hormonas. El nombre de PPAR deriva de la primera isoforma clonada que respondía a varios compuestos xenobióticos/hepatocarcinogénicos y provocaba la proliferación de los peroxisomas en el hígado. El primer miembro identificado de la subfamilia fue PPARalfa (PPAR $\alpha$ ) (Isseman I et al, Nature 1990) y posteriormente se identificaron otros miembros como PPARgamma (PPAR $\gamma$ ) y PPARbeta o también conocido como PPARdelta (PPAR $\beta/\delta$ ). Cada uno de los miembros de la subfamilia de los PPARs está codificado por distintos genes y presentan diferentes patrones de distribución en el tejido (Rosen ED y Spiegelman BM, JBC 2001). Los miembros de la familia de los PPARs realizan funciones diferentes, muchas de las cuales se han identificado a partir de la identidad de los genes que regulan e influyen (Kersten S et al, Nature 2000).

PPAR $\alpha$  estimula principalmente la degradación de los ácidos grasos en la  $\beta$ -oxidación por lo que se expresa en tejidos activos en el catabolismo como el hígado, riñón, corazón y músculo (Kersten S et al, JCI 1999). Isseman y Green demostraron que PPAR $\alpha$  es activado por los fibratos actuando como ligandos sintéticos que inducen la proliferación de los peroxisomas y la oxidación de los AG en modelos murinos. Actualmente estos agonistas de PPAR $\alpha$  se utilizan como fármacos reductores de los niveles de triglicéridos en suero (Isseman I et al, Nature 1990). En cambio PPAR $\delta$  se expresa de forma ubicua en diversos tejidos como músculo, corazón, tejido adiposo, cerebro, intestino, bazo, pulmón y glándulas adrenales. Además de realizar un papel importante en el metabolismo de los ácidos grasos en multitud de tejidos, participa en la proliferación y diferenciación celular. Por lo que PPAR $\delta$  es una diana terapéutica que cubre multitud de aspectos en la enfermedad metabólica ya que aporta beneficios frente a la RI y la hipertriglicemia, favorece

el catabolismo de los AG en músculo y tejido adiposo, y mitiga las respuestas inflamatorias de los macrófagos (**Barish GD et al, JCI 2006**).

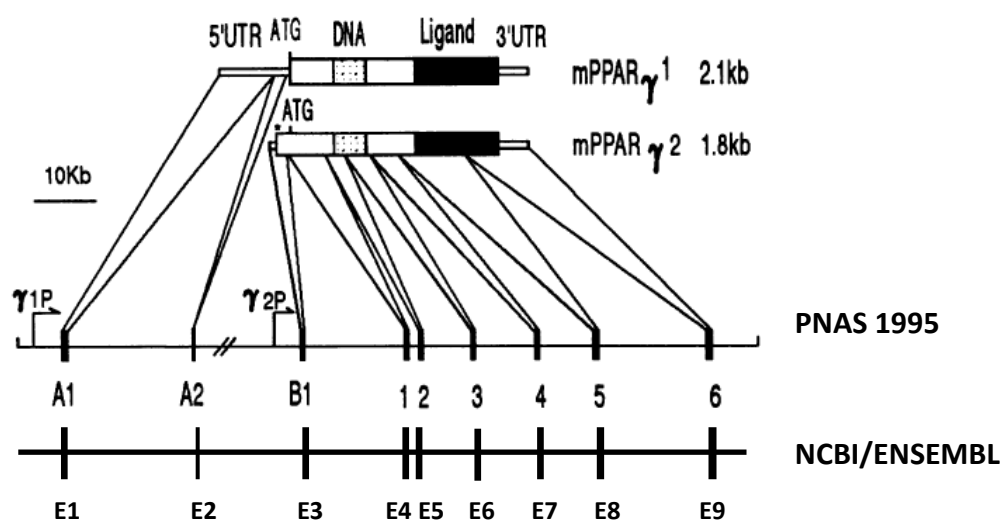
PPAR $\gamma$  inicialmente fue identificado por ejercer un papel central como regulador de la adipogénesis, pero además ejerce multitud de funciones en vías de señalización básicas modulando el metabolismo lipídico, la homeostasis de carbohidratos, la diferenciación celular, la inflamación, y participa de forma activa en la DM tipo II, la EHGNA, la aterosclerosis y el cáncer (**Rosen ED y Spiegelman BM, JBC 2001**). En 1992, PPAR $\gamma$  fue identificado por clonación homóloga primero en *Xenopus* y el año posterior en ratón, al mismo tiempo el grupo de Spiegelman lo identificó formando parte en la clonación de ARF6, el factor responsable del control de la transcripción del gen proteína adiposa-2 (aP2) o también conocida como proteína de unión 4 a AG (FABP4) (**Dreyer C et al, Cell 1992; Zhu Y et al, JBC 1993; Graves RA et al, Mol Cell Biol 1992**).

PPAR $\gamma$  se expresa predominantemente en tejido adiposo y en menor cantidad en hígado, músculo, cerebro, macrófagos y placenta. A partir de un mismo gen, se originan 2 isoformas distintas de la proteína, PPAR $\gamma$ 2 difiere de PPAR $\gamma$ 1 por la presencia de 30 aminoácidos extra en ratón (28 en humano) en el extremo amino terminal (N-terminal) de la proteína; de forma que la isoforma 2 es mejor activador transcripcional respecto que la isoforma 1 (**Werman A et al, JBC 1997**). Además de presentar diferentes estructuras proteicas, PPAR $\gamma$ 1 y PPAR $\gamma$ 2 muestran distintos patrones de expresión, PPAR $\gamma$ 1 se expresa de forma ubicua mientras que la expresión de PPAR $\gamma$ 2 se limita principalmente al tejido adiposo en condiciones fisiológicas pero su expresión puede ser inducida en otros tejidos por la exposición a dietas de alto contenido de grasas (**Heikkinen S BBA 2007**).

## IV. PPAR $\gamma$

### 4.1- ESTRUCTURA DE PPAR $\gamma$ MURINO

La organización estructural del gen de PPAR $\gamma$  muestra la codificación de 2 isoformas distintas en ratón debido al uso de promotores alternativos y de diferencias en los patrones de *splicing* o empalme del ARN específicas de tejido. El gen de PPAR $\gamma$  en ratón se extiende >105 kb, se sitúa en la región E3-F1 del cromosoma 6 y consta de 9 exones. Las isoformas PPAR $\gamma$ 1 y PPAR $\gamma$ 2 se diferencian entre ellas en el extremo 5' del ARN mensajero; de forma que el ADN complementario de PPAR $\gamma$ 2 codifica 30 aminoácidos adicionales en el extremo N-terminal de la proteína y su codificación precede al codón ATG de inicio de la isoforma PPAR $\gamma$ 1. En concreto, PPAR $\gamma$ 1 está codificada por 8 exones mientras que PPAR $\gamma$ 2 está codificado por 7 exones, por lo que la secuencia sin traducir del extremo 5' de la isoforma 1 está codificada por 2 exones y en cambio la isoforma 2 presenta solo 1 exón que codifica tanto una secuencia sin traducir como los 30 aminoácidos extra (Figura 8).

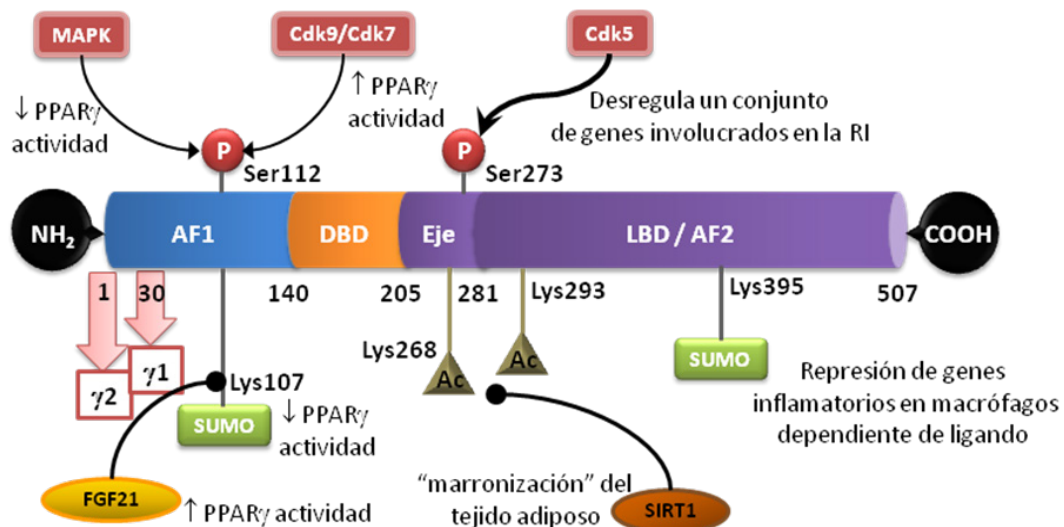


**Figura 8. Estructura del gen de PPAR $\gamma$  murino.** Ambas estructuras muestran los 9 exones presentes en el ADN genómico del gen de PPAR $\gamma$ , la barra inferior muestra la nomenclatura actual presente en las bases de datos del NCBI/ENSEMBL y la barra superior indica la nomenclatura descrita por Zhu y colaboradores que permite distinguir los exones correspondientes entre las diferentes isoformas (Identifica como 1-6 los exones comunes en las dos isoformas empezando por el codón de inicio ATG, además PPAR $\gamma$ 1 está codificado por los exones A1-A2 y PPAR $\gamma$ 2 por el exón B1).  $\gamma$ 1P y  $\gamma$ 2P representan los promotores de PPAR $\gamma$ 1 y PPAR $\gamma$ 2, respectivamente. La parte superior muestra las moléculas resultantes de ADN codificante para cada una de las isoformas, se indican las regiones no codificantes (UTR) en los extremos 5' y 3', el codón de inicio ATG, los 30 aminoácidos adicionales codificados en el extremo N-term de PPAR $\gamma$ 2 (\*) y los dominios de unión al ADN (DNA) y de unión al ligando (Ligand). (Figura adaptada de Zhu y et al PNAS 1995)

Siguiendo la nomenclatura de NCBI y EMSEMBL, el exón que codifica el inicio de PPAR $\gamma$ 2 se identifica como E3 ( $\gamma$ B1 según la nomenclatura descrita por Zhu y colaboradores) y se encuentra localizado entre el segundo y el tercer exón de PPAR $\gamma$ 1 (designados como  $\gamma$ A1 y  $\gamma$ A2 o E2 y E4 del gen siguiendo NCBI y ENSEMBL). Por lo que el exón en común entre las dos isoformas es el E4, el cual forma parte de los 6 últimos exones del gen que codifican para las dos isoformas, la región codificante de la proteína (**Zhu Y et al, PNAS 1995**).

La estructura proteica de PPAR $\gamma$  contiene dominios característicos de receptores nucleares de hormonas y es idéntica entre ambas isoformas. PPAR $\gamma$  se compone de 4 partes funcionales (**Figura 9**):

- La región A/B en el extremo N-terminal contiene el motivo de activación-1 independiente de la unión al ligando (AF-1) que puede actuar como modulador de la actividad del receptor al integrar vías de señalización y afectar en la especificidad de activación del gen diana (**Feige JN et al, Progress in Lipid Research 2006**).
- La región C contiene el dominio de unión al ADN (DBD), en concreto a los elemento de respuesta a los proliferadores de peroxisomas (PPRE).
- La región D, o dominio eje, puede unirse a varios cofactores o reguladores de la transcripción
- En el extremo carboxil terminal (C-terminal) se encuentra la región E/F contiene la zona de dimerización con RXR $\alpha$ , el motivo de activación-2 dependiente de la unión al ligando (AF-2) donde también pueden unirse proteínas coreguladoras, y un gran dominio de unión al ligando (LBD). El dominio LBD en la zona C-terminal forma un bolsillo de unión a la cabeza polar del ligando extendiendo las cadenas de residuos hidrofóbicos hacia el exterior. Por otro lado, el extremo N-terminal de la proteína puede influenciar sobre la respuesta del dominio de unión a ligando AF-2 según su estado de fosforilación (**Feige JN et al, Progress in Lipid Research 2006; Tontonoz P y Spiegelman BM, Annu Rev Biochem 2008**).



**Figura 9. Estructura proteica de PPAR $\gamma$  mostrando los dominios y modificaciones covalentes.** El inicio de cada una de las isoformas aparece en la parte inferior indicando la posición del aminoácido respecto la isoforma 2 (más larga). Localización, moléculas efectoras y tipo de modificaciones post-traduccionales de PPAR $\gamma$ . NH<sub>2</sub>, extremo N-terminal; COOH, extremo C-terminal; DBD, dominio de unión al ADN; LBD, dominio de unión a ligando; Ac, acetilación; P, fosforilación; Cdk5, ciclina dependiente de quinasa 5; Cdk9/Cdk7, ciclina dependiente de quinasa 7 y 9 (Figura adaptada de Floyd ZE et al, BBA 2012; Ahmadian M et al, Nature Medicine 2013)

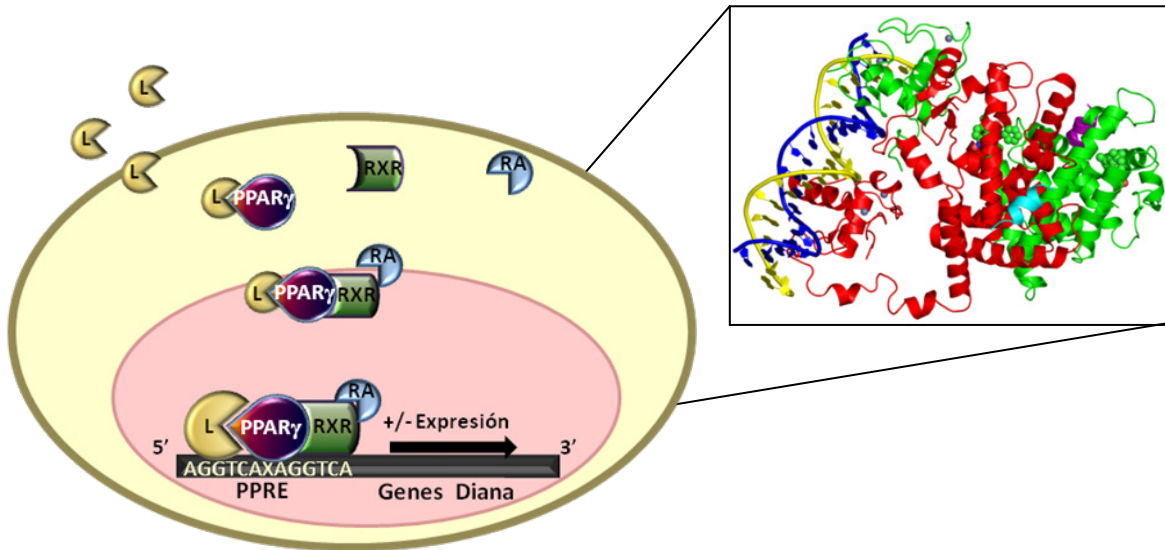
## 4.2- MECANISMOS DE ACCIÓN DE PPAR $\gamma$

### 4.2.1. Regulación de la actividad transcripcional de PPAR $\gamma$

Los miembros de la familia de los PPARs se describen como factores de transcripción activados por unión al ligando, por ello la actividad transcripcional de PPAR $\gamma$  puede ser controlada por la unión promiscua de pequeños ligandos lipofílicos en el bolsillo creado por el dominio LBD. Los PPARs requieren la heterodimerización con otro miembro de la familia de receptores nucleares de hormonas, el receptor X de retinoides (RXR) al que se une el ácido 9-*cis* retinoico. PPAR $\gamma$  se une al factor de transcripción RXR $\alpha$  (RXR $\alpha$ ). Una consecuencia de esta heterodimerización es la posibilidad de ser activados por ligandos específicos de PPAR $\gamma$ , RXR $\alpha$  o ambos, provocando un efecto sinérgico en el último caso. Una vez activados, el complejo PPAR $\gamma$ :RXR $\alpha$  se transloca al núcleo donde puede activar o reprimir la transcripción de los genes diana al unirse de forma específica a los PPRE a través de su dominio de unión al ADN (región C) según los cofactores unidos al complejo. PPRE se localiza en la región del promotor de genes diana y consiste en dos secuencias hexaméricas de reconocimiento al receptor nuclear separadas por uno nucleótido



(AGGTCA-X-AGGTCA, este tipo de secuencias se conocen como DR-1) (**Figura 10**) (**Werman A et al, JBC 1997; Kersten S et al, Nature 2000**).



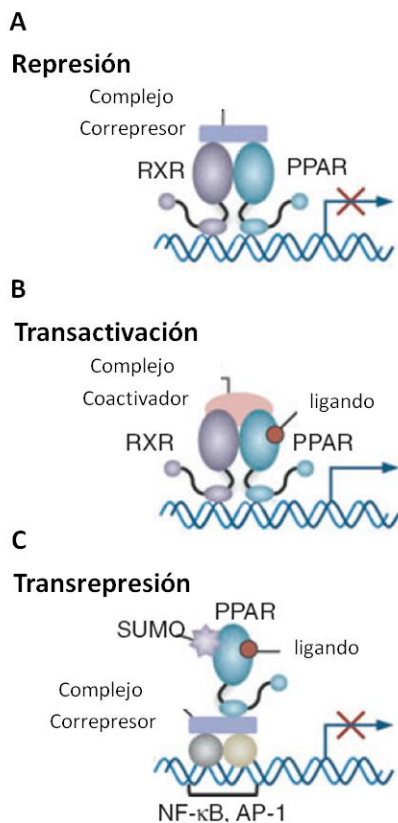
**Figura 10. Representaci3n esquemática de la activaci3n transcripcional de PPAR $\gamma$ .** Izquierda, insert: Estructura cristalográfica del complejo PPAR $\gamma$ :RXR $\alpha$  (en rojo y verde, respectivamente) junto con dos coactivadores de receptor nuclear de esteroides (NCO2, lila y turquesa) unidos a la doble cadena de ADN (cadenas azul y amarilla). La identificaci3n de la imagen obtenida del Banco de Datos de Proteinas (RCSB PDB) corresponde a 3e00.

### Represi3n o Transactivaci3n

Una vez se forma el complejo PPAR $\gamma$ :RXR $\alpha$ , la actividad transcripcional de PPAR $\gamma$  depende de la uni3n del ligando al receptor nuclear y puede ser modulada por sus interacciones con un gran número de correguladores. Por tanto la presencia y los niveles de expresi3n de los cofactores son importantes ya que determinan la especificidad fisiol3gica y respuesta de los ligandos de PPAR $\gamma$  o RXR $\alpha$ .

En ausencia de ligando para prevenir la uni3n del heterodímero PPAR $\gamma$ :RXR $\alpha$  a la secuencia PPRE del promotor, el heterodímero inactivo forma un complejo al asociarse a proteínas nucleares correpresoras en asociaci3n con deacetilasas de histonas, estos sucesos descritos por Guan y colaboradores se observaron en el promotor del gen glicerol kinasa (**Figura 11 A**) (**Guan HP et al, Genes Dev 2005**). Las proteínas correpresoras descritas hasta el momento que regulan la actividad de PPAR $\gamma$  son el correpresor de receptor nuclear NCoR-1 y el correpresor hom3logo mediador del silenciamiento de receptores para retinoides SMRT. De esta forma se reprime la

expresión del gen diana ya que el complejo correpresor modifica las histonas de la cromatina adyacente (enzimas deacetilases) silenciando así el promotor del gen (**Feige JN et al, Progress in Lipid Research 2006; Floyd SE et al, BBA 2012**).



**Figura 11. Mecanismos de control transcripcional de PPAR $\gamma$ .** (A) Represión, ocurre en ausencia de ligando cuando el heterodímero PPAR $\gamma$ :RXR $\alpha$  se encuentra unido a los PPRE y los complejos correpresores que reprimen la transcripción de los genes diana. (B) La transactivación depende de la unión del ligando y que produce cambios conformacionales del heterodímero PPAR $\gamma$ :RXR $\alpha$  que provocan la liberación de los complejos correpresores y el reclutamiento de los complejos coactivadores para iniciar la transcripción. (C) Transrepresión, la activación de PPAR $\gamma$  por unión del ligando reprime la expresión de genes inflamatorios a través de la unión del complejo correpresor en los promotores de los genes diana del factor de transcripción reprimido (ejemplo de la figura para el caso de NF- $\kappa$ B o AP-1). (Figura adaptada de Kidani Y et al, Immunological Reviews 2012)

Una vez se une el ligando se produce un cambio conformacional en el complejo-heterodímero nuclear que causa la disociación del complejo correpresor y su reemplazo por proteínas nucleares coactivadoras (**Figura 11 B**). Una mayor categoría de coactivadores de PPAR $\gamma$  es la familia de las proteínas p160 que incluye la proteína de unión al elemento de respuesta al AMPcíclico (CBP)/p300 y el coactivador del receptor de esteroides (SRC)-1,-2,-3 (o también llamados NCOA-1,-2). Otra categoría de coactivadores incluyen subunidades de los complejos proteicos PBP/TRAP/DRIP, que interactúan con la maquinaria transcripcional para el montaje del complejo-heterodímero. El heterodímero interactúa con al menos dos complejos coactivadores CBP/p300 y DRIP para promover la transactivación ya que reclutan modificadores de histonas (enzimas acetilases) y de esta forma el heterodímero PPAR $\gamma$ :RXR $\alpha$  puede unirse libremente a los PPRE del gen diana (**Feige JN et al, Progress in Lipid Research 2006; Ricote M et al, BBA 2007; Floyd SE et al, BBA 2012**).

PPAR $\gamma$  controla directamente por transactivación la expresión de multitud de genes que presentan secuencias PPRE y son clave para el metabolismo lipídico, la señalización de la insulina, la producción de adipocinas, la adipogénesis, el ciclo celular o el metabolismo de carbohidratos. Muchos de los genes diana de

PPAR $\gamma$  participan en el metabolismo de los lípidos regulando procesos como el transporte de lípidos (FATP), la captación (por ejemplo la lipoproteína lipasa o LPL, o FATBP4), el reciclaje de AG intracelulares (PEPCK/PCK1, glucocinasa o GK, aquaporina 7 o AQP7) y la lipólisis (receptor 81 antilipolítico unido a la proteína G o GPR81).

### **Transrepresión**

Los receptores nucleares presentan otros mecanismos de acción a nivel no-genómico. Es decir, a diferencia de la represión directa, el mecanismo de transrepresión que realizan los receptores nucleares no requiere reconocimiento de regiones específicas del ADN por lo que la transrepresión ejercida se produce a partir de una señal específica e independiente de secuencias específicas de ADN (**Figura 11 C**). (**Kidani Y et al, Immunological Reviews 2012**). En concreto, PPAR $\gamma$  participa dentro del complejo proteico de transrepresión mediando efectos de represión e inhibición de la unión de factores de transcripción a la molécula de ADN. PPAR $\gamma$  puede activar la transcripción de proteínas dependiendo de la unión al ligando y coactivadores (transactivación, *ver apartado anterior*), pero en el caso de la transrepresión, los ligandos de PPAR $\gamma$  pueden antagonizar las vías de traducción donde participa el receptor (ver SUMOilación en apartado 4.2.2). La transrepresión puede suceder secuestrando factores de transcripción e inhibiendo la capacidad de unión al ADN a través de interacciones directas proteína-proteína (*tethering*), o bien secuestrando cofactores necesarios para la transactivación (*sqelching*) (**Feige JN et al, Progress in Lipid Research 2006; Ricote M et al, BBA 2007**).

#### **4.2.2. Regulación de PPAR $\gamma$ por modificaciones covalentes**

Las interacciones no covalentes producidas entre PPAR $\gamma$  y otras proteínas ejercen un gran control de la actividad de PPAR $\gamma$  pero pueden ser reguladas por modificaciones covalentes. Las modificaciones post-translacionales covalentes como la SUMOilación, fosforilación, acetilación o

ubiquitinación influyen la actividad transcripcional, los niveles de expresión y la estabilidad proteica de PPAR $\gamma$  dependiendo del tipo celular y el contexto biológico (**Figura 9**).

### **Fosforilación de PPAR $\gamma$**

Al igual que en otras familias de receptores nucleares, los PPARs al ser fosfoproteínas, su actividad transcripcional se encuentra afectada por una comunicación cruzada con proteínas quinasas y fosfatasas, afectando su actividad de forma dependiente u independiente a la unión del ligando (**Figura 9**). La activación de factores de crecimiento de la familia de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) (como los factores de crecimiento epidérmico, fibroblástico o derivado de plaquetas - EGF, FGF y PDGF) provoca la fosforilación en el motivo AF-1 del extremo N-terminal, en concreto en la serina112 (serina82 de PPAR $\gamma$ 1) y causan la inhibición de la adipogénesis. La fosforilación mediada por las MAPKs en la serina112 causa la inhibición de la actividad de PPAR $\gamma$  ya que provoca un cambio conformacional en el receptor afectando la unión del ligando en el dominio LBD del extremo C-terminal de la proteína y la habilidad de reclutamiento de los coactivadores. En cambio, la fosforilación de la misma serina112 por las la ciclina dependiente de quinasa 7 y 9 (Cdk7 y Cdk9) incrementa la actividad de PPAR $\gamma$  (**Floyd ZE et al BBA 2012; Ahmadian M et al, Nature Medicine 2013**) Otro sitio de fosforilación en PPAR $\gamma$ 2 se encuentra localizado en la serina273 del dominio LBD. En modelos de obesidad por administración de dieta rica en grasa, la ciclina dependiente de quinasa-5 (Cdk5) puede ser activada por varias citoquinas proinflamatorias en el tejido adiposo y media la fosforilación en PPAR $\gamma$ . La modificación no activa ni suprime la actividad transcripcional de PPAR $\gamma$  ya que no afecta la conformación del receptor pero puede alterar la expresión de genes diana en adipocitos como la adiponectina. La fosforilación en la serina273 se ha relacionado con la obesidad y la DM tipo II ya que la inhibición de esta fosforilación en humanos por rosiglitazona se asocia a efectos antidiabéticos (**Choi JH et al, Nature 2010; Ahmadian M et al, Nature Medicine 2013**).

### **SUMOilación de PPAR $\gamma$**

Las “pequeñas proteínas modificadoras parecidas a la ubiquitina” (SUMO) pueden conjugarse a proteínas a través de uniones covalentes y regular mecanismos celulares como la represión transcripcional. La SUMOilación de PPAR $\gamma$  media la represión de la actividad transcripcional que ejerce el receptor nuclear, de hecho aunque solo una pequeña parte del receptor nuclear este modificado por SUMOilación puede regular la actividad de PPAR $\gamma$  ya que depende del reclutamiento de cofactores. PPAR $\gamma$  puede modificarse de forma reversible a través de dos sitios de SUMOilación (**Figura 9** y **Figura 11 C**). Primero, la modificación en el aminoácido lisina107 (lisina77 en PPAR $\gamma$ 1) del dominio AF-1 provoca un efecto represivo en los aminoácidos 100-138 por lo favorece la interacción con la proteína correpresora p300 y las enzimas deacetilasas de histonas. Respecto a la SUMOilación dependiendo de ligando en la lisina 395 (lisina365 en PPAR $\gamma$ 1) del dominio LBD se ha demostrado que en el macrófago inhibe la transcripción de genes inflamatorios al promover la interacción de PPAR $\gamma$  con los complejos correpresores NCoR-deacetilasa de histonas 3 en los promotores de dichos genes (**Feige JN et al, Progress in Lipid Research 2006; Floyd ZE et al BBA 2012; Ahmadian M et al, Nature Medicine 2013**).

En concreto, Glass y colaboradores señalaron como PPAR $\gamma$  puede reprimir la expresión de genes inflamatorios en una secuencia de acontecimientos donde participan modificaciones covalentes (**Pascual G et al, Nature 2005**). En un estado no inflamatorio, los genes diana del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (sintasa inducible por óxido nítrico iNOS o proteína quimiotáctica de monocitos MCP-1) se encuentran en un estado reprimido por la unión de complejos correpresores en los promotores de dichos genes. Después de un estímulo inflamatorio, los complejos correpresores pueden ser ubiquitilados y degradados por el proteasoma 19S, mientras que NF- $\kappa$ B es activado por las señales inflamatorias *Toll-like* receptor (TLR) provocando así su translocación y unión a los promotores de los genes proinflamatorios. La activación de PPAR $\gamma$  en respuesta a rosiglitazona provoca un cambio conformacional del heterodímero PPAR $\gamma$ :RXR $\alpha$  a monómero por lo que permite la SUMOilación de PPAR $\gamma$  en la lisina 365 y el subsecuente

reclutamiento al promotor de los genes diana de NF- $\kappa$ B (p.e. iNOS) debido a la unión del complejo correpressor NCoR. La asociación de PPAR $\gamma$  con NCoR evita la disociación del ADN por lo que preserva el estado de transrepresión, evitando la expresión de genes inflamatorios. La SUMOilación de PPAR $\gamma$  con la unión al complejo NCoR también se ha asociado con la transrepresión de los promotores diana del factor de transcripción la proteína activadora-1 (AP-1) a través de la interacción con la proteína c-Jun y provocando así la represión de genes inducibles por la señal de activación TLR (**Figura 11 C**).

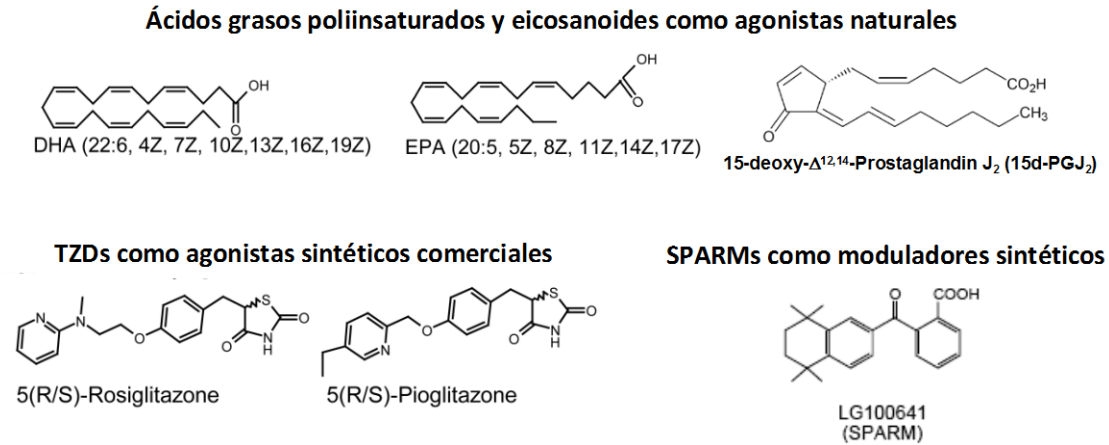
### **Ubiquitinación y Acetilación de PPAR $\gamma$**

Los procesos de ubiquitinación y de degradación de proteínas producida por el proteasoma se encuentran relacionados con la actividad transcripcional de los receptores nucleares, de esta forma se regulan los niveles de receptor nuclear presentes en la célula pero también la relación existente entre la actividad del proteasoma y la transcripción génica. En el adipocito, el sistema ubiquitina-proteasoma regula la tasa de renovación de PPAR $\gamma$  de forma dependiente u independiente de la unión a ligando. La unión al ligando incrementa las modificaciones por ubiquitinación en el dominio LBD de PPAR $\gamma$  y su degradación, se ha sugerido que la ubiquitinación de PPAR $\gamma$  precede a la unión de coactivadores en el motivo AF-2 formando parte de la regulación de la activación transcripcional de PPAR $\gamma$  y controlando la cantidad de proteína en el adipocito (**Figura 9**) (**Floyd ZE et al, BBA 2012**).

Además recientemente se ha descubierto la deacetilación de PPAR $\gamma$  en la lisina268 y lisina293 por la proteína sirtuína1 (SIRT1) que promueve el reclutamiento del factor de transcripción PRDM16 (relacionado con el desarrollo de tejido adiposo marrón) hacia PPAR $\gamma$  , de esta forma se ha sugerido una nueva vía de señalización de inducción de la “marronización” del tejido adiposo (**Ahmadian M et al, Nature Medicine 2013**).

### 4.3- LIGANDOS de PPAR $\gamma$

Los ligando naturales y sintéticos de PPAR $\gamma$  presentan una estructura similar generalmente compuesta por un cuerpo polar (comprende el grupo carboxilado) y una cola hidrofóbica (**Figura 12**).



**Figura 12. Estructura química de ligandos representativos de PPAR $\gamma$ .** Ligandos naturales como los PUFA de la serie n-3 (DHA y EPA) y la prostaglandina 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ<sub>2</sub>, ligandos sintéticos como los fármacos sensibilizantes a la insulina tiazoglitazonas (Rosiglitazona y Pioglitazona) y moduladores sintéticos como los SPARM (LG100541)

#### 4.3.1. Ligandos biológicos

A partir de screenings para localizar ligandos naturales se examinaron una variedad de ácidos grasos y derivados de ácidos grasos endógenos derivados de la nutrición o de vías de señalización metabólicas (**Rosen ED et al, JBC 2001**). Aunque su unión al receptor se caracteriza por ser de baja afinidad (>10-30  $\mu$ M), se identificaron varios ácidos grasos PUFA como ligandos biológicos que pueden activar PPAR $\gamma$ . En concreto se identificaron como ligandos endógenos dentro de la serie omega-6 (n-6, 20 carbonos) a el ácido linoléico (AL, 18:2 n-6) y el ácido araquidónico (AA, 20:4, n-6), además de los PUFA de la serie omega-3 como el ácido eicosapentanoico (EPA; 20:5, n-3) y el ácido docosahexaenoico (DHA, 22: 6, n-3) (**Figura 12**). De hecho, un estudio reciente realizado por nuestro grupo identificó el papel protector que derivados lipídicos de DHA como el 17S-hidroxi-DHA (17HDHA) realizan contra el daño hepático, actuando como agonistas de PPAR $\gamma$  de forma dependiente de concentración (**González-Pérez A et al, FASEB J 2006**). También se reveló que PPAR $\gamma$  puede ser activado por metabolitos del AA derivados de las vías de la ciclooxigenas (COX) y



lipooxigenasa (LO). En concreto, dos ecosainoides derivados del AA se han identificado como los ligando naturales con mayor afinidad, en primer lugar la 15-deoxy- $\Delta$ -12,14-prostaglandina J<sub>2</sub> (15-dPGJ<sub>2</sub>) que es metabolizada a través de la vía de COX-2 y constituye el agonista natural más potente (>0.1-1  $\mu$ M) (**Figura 12**), y en segundo lugar el ácido 15-hidroxiieicosatetraenoico (15-HETE) derivado de la vía de la 12/15-LO que presenta menor afinidad. Concretamente, en un estudio realizado por nuestro grupo con el inhibidor selectivo de COX-2 (Celecoxib) se demostró que Celecoxib actúa como agonista de PPAR $\gamma$  sin alterar la unión y activación que realiza el agonista por excelencia 15-dPGJ<sub>2</sub>, de esta forma se demostró que PPAR $\gamma$  actúa como mediador de las acciones farmacológicas de Celecoxib en cirrosis sin afectar la función renal (**López-Parra M et al, J of Hep 2005**). Por otro lado, tanto los ácidos 9-hidroxiioctadecadienoico (9-HODE) y 13-hidroxiioctadecadienoico (13-HODE) derivados de la metabolización de AL, como las especies oxidadas originadas de su posterior conversión, tienen un gran impacto en la activación del receptor nuclear PPAR $\gamma$  (>0.1-10  $\mu$ M) y se encuentran en elevadas concentraciones en las lesiones ateroscleróticas (**Forman BM et al, Cell 1995; Kliewer SA, Cell 1995; Kliewer SA et al, PNAS 1997; Rosen ED et al, JBC, 2001; Edwards IJ et al, PPAR Research 2008**).

#### 4.3.2. Ligandos sintéticos

Además de la importante función proadipogénica de PPAR $\gamma$ , y debido a la relación existente entre la obesidad y la RI, es significativo recalcar que PPAR $\gamma$  sirve como receptor de la familia de fármacos antidiabéticos: las tiazolidinedionas (TZDs) (**Figura 12**). El grupo de Kliewer demostró que los fármacos sensibilizantes a la insulina, las TZDs, actuaban como agonistas del receptor nuclear PPAR $\gamma$  e inducían diferenciación del adipocito (**Lehmann JM et al, JBC 1995**).

Otros compuestos farmacológicos han sido identificados como activadores de los PPARs, en concreto los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) responsables de la inhibición de los efectos inflamatorios efectuados por la vía de la COX. Lehmann y colaboradores demostraron que tanto el fármaco indometacina como el ibuprofeno son activadores de PPAR $\gamma$ , y en

correspondencia con el papel adipogénico de PPAR $\gamma$  pueden actuar a concentraciones bajas promoviendo la diferenciación de la línea celular C3H10T1/2 a adipocitos (**Lehmann J et al, JBC 1997**).

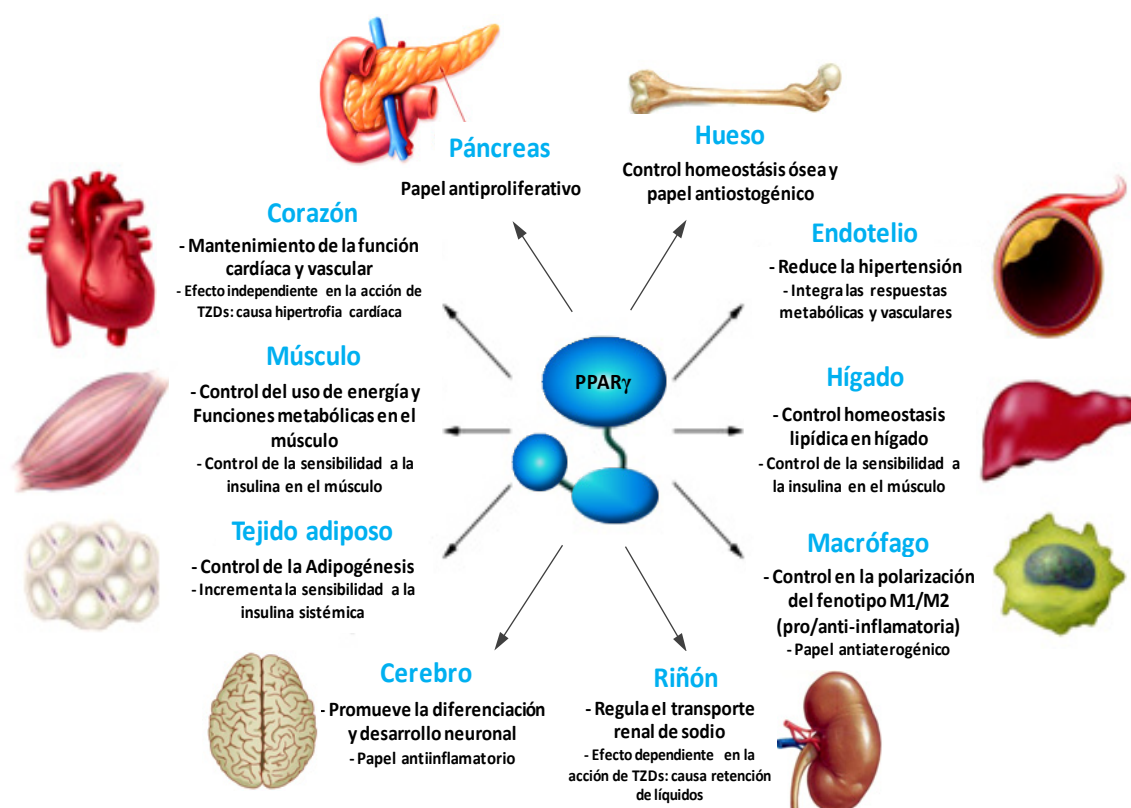
#### **4.3.3. Moduladores sintéticos**

Debido a el tamaño del dominio LBD de PPAR $\gamma$  y la influencia que ejercen las proteínas coreguladoras en su actividad transcripcional, se han descrito diversas clases de moléculas sintéticas que pueden actuar como ligandos sintéticos de PPAR $\gamma$ . El término “modulador selectivo de receptores de estrógeno” (SERM) incluyen a los ligandos específicos para un receptor nuclear que actúan como modulador en vez de actuar como agonista o antagonista. Por analogía al concepto que representan los SERM, se ha sugerido el término SPARM para referirse a los “moduladores específicos de PPAR $\gamma$ ” (**Figura 12**). Las bases moleculares para la actividad selectiva de los SERMs o SPARM se determinan por la habilidad de modular la actividad del receptor dependiendo del tejido y contexto celular a través de alterar la fuerza y tipo de interacción entre el receptor-cofactor. Así mismo, los ácidos grasos pueden ser considerados como SPARMs naturales ya que su unión al complejo PPAR $\gamma$ :RXR $\alpha$  no siempre conlleva la activación y la transcripción del gen diana. El uso de SPARMs y/o la oportunidad de combinarlo con otros moduladores o moléculas clave en vías de señalización ofrece la posibilidad de integrar PPAR $\gamma$  en otras áreas como la inflamación o regulación del ciclo celular, así representar nuevos retos clínicos en el tratamiento de cáncer, diabetes, aterosclerosis o enfermedades inflamatorias (**Sporn MB et al, TRENDS Mol Med 2001**).

#### **4.4- FUNCIONES de PPAR $\gamma$**

PPAR $\gamma$  presenta una naturaleza biológica altamente compleja manifestada tanto en los efectos fenotípicos que provocan las variantes génicas encontradas en el gen humano de PPAR $\gamma$  como en las alteraciones fisiológicas descritas en los modelos murinos modificados a nivel de expresión de

PPAR $\gamma$  (**Figura 13**). Barak y colaboradores demostraron que PPAR $\gamma$  participa en funciones fisiológicas importantes debido a que se requiere su presencia y acción para el desarrollo placentario, cardíaco y adipogénico (**Barak Y et al, Mol Cell 1999**). Evidencias múltiples confirman el papel de PPAR $\gamma$  en la adipogénesis, mantenimiento del metabolismo de los lípidos y carbohidratos, la homeostasis ósea, y en el control de la inflamación y la presión sanguínea. Pero además se ha descrito las funciones específicas que realiza PPAR $\gamma$  en los diversos tejidos: en el tejido adiposo PPAR $\gamma$  regula la adipogénesis, se ha descrito un papel inflamatorio en epitelio intestinal y en el cerebro, PPAR $\gamma$  específicamente en el endotelio modula la hipertensión derivada de una dieta rica en grasa, PPAR $\gamma$  expresado en los conductos de recogida del riñón controla la retención de fluidos, y finalmente PPAR $\gamma$  presente en el tejido adiposo, hígado, músculo y expresado en macrófago trabaja conjuntamente para mantener el estado normal de sensibilidad a la insulina (**Heikkinen S et al, BBA 2007; Barak Y et al, PPAR Research 2007**)



**Figura 13. Funciones de PPAR $\gamma$  en el organismo.** (Figura adaptada de Barish GD et al, JCI 2006)

#### **4.5- VARIANTES GENÉTICAS HUMANAS DE PPAR $\gamma$**

La identificación y descripción de mutaciones y variaciones en el gen de PPAR $\gamma$  enfatiza el complejo papel biológico que ejerce PPAR $\gamma$  en la adipogénesis humana y sensibilidad a la glucosa. El polimorfismo Pro12Ala en la isoforma 2 del gen de PPAR $\gamma$  es el factor de riesgo con mayor asociación genética a sufrir diabetes tanto en estudios independientes como en estudios de meta-análisis. Por otra parte, el polimorfismo Pro12Ala también se ha asociado con fenotipos de longevidad, aterosclerosis, hipertensión, incremento de peso al nacer, cáncer y EHGNA (**Florez JC et al, Annu Rev Genomics Hum Genet 2003; Heikkinen S et al, BBA 2007; Tontonoz P and Spiegelman BM, Annu Rev Biochem 2008; Gupta AC et al, Hepatol Int 2010**).

También han sido identificadas mutaciones del tipo dominante-negativas y de pérdida de función en el gen de PPAR $\gamma$  en sujetos con características clínicas comunes: lipodistrofia, resistencia a la insulina severa (RI), dislipidemia, esteatosis hepática, diabetes e hipertensión (como por ejemplo 185Stop, Val290Met, Arg425Cys o Pro467Leu). Además se ha identificado Pro115Gln como una mutación de incremento de función provocando la activación constitutiva de PPAR $\gamma$  y, en consecuencia, obesidad extrema mientras que la sensibilidad a la insulina se mantiene en un estado normal (**Semple RK et al, J Clin Invest 2006; Heikkinen S et al, BBA 2007; Tontonoz P and Spiegelman BM, Annu Rev Biochem 2008**).

## V- EVIDENCIAS DEL PAPEL DE PPAR $\gamma$ EN LA EHGNA

### 5.1- LECCIONES DESDE MODELOS ANIMALES

La generación de ratones deficientes en PPAR $\gamma$  fue la primera aproximación para investigar el papel de PPAR $\gamma$  *in vivo*. En 1999 dos grupos en paralelo publicaron el proceso de creación por recombinación homóloga de ratones KO de PPAR $\gamma$  (**Barak Y et al, Molecular Cell 1999; Kubota N et al, Molecular Cell 1999**). En el caso del grupo liderado por el profesor Evans, el gen de PPAR $\gamma$  se invalidó a partir de la inserción de un casete de secuencias que codifican la enzima  $\beta$ -galactosidasa (LacZ) junto con el gen de resistencia al antibiótico neomicina. La mutación se realizó en el segundo exón codificante para las 2 isoformas de PPAR $\gamma$  por encima del dominio de unión al ADN (según NCBI/ENSEMBL el exón 4). Esta estrategia anula las funciones de PPAR $\gamma$  tanto a nivel de unión al ADN como al ligando (**Barak Y et al, Molecular Cell 1999**). Inicialmente se obtuvieron ratones haploinsuficientes (PPAR $\gamma^{+/-}$ , heterocigotos en el gen de PPAR $\gamma$ ) completamente fértiles y desarrollados. No obstante, fue imposible la generación de ratones homocigotos deficientes de PPAR $\gamma$  (PPAR $\gamma^{-/-}$ ) a partir del cruce de ratones PPAR $\gamma^{+/-}$  debido a que mueren en el útero en la fase E11 como resultado de disfunciones en la placenta y defectos cardíacos. Aunque solo un ratón PPAR $\gamma^{-/-}$  pudo ser rescatado de la agregación tetraploide, murió a los pocos días debido al grave fenotipo que presentaba por hemorragias, hígado graso y lipodistrofia severa. De esta forma se demostró el papel esencial que realiza PPAR $\gamma$  en el desarrollo embrionario, perinatal y en el proceso de la adipogénesis.

El siguiente paso fue estudiar la función de PPAR $\gamma$  en ratones haploinsuficientes y detectar los efectos causados en las vías influenciadas por PPAR $\gamma$  debido a la reducción en un 50% de su dosis. De hecho, el modelo de haploinsuficiencia es controvertido al presentar un fenotipo contrario al esperado; en términos de efectos a nivel de sensibilidad a la insulina no se observó una reducción en este parámetro tras el descenso en los niveles del receptor de TZDs. Varios estudios realizados en ratones heterocigotos PPAR $\gamma^{+/-}$  mostraron que la presencia de un solo alelo de PPAR $\gamma$  crea una

menor predisposición a sufrir RI después de someterlos a una DRG o por longevidad, los ratones PPAR $\gamma^{+/-}$  presentan mayor sensibilidad a la insulina aunque los posibles motivos crearon discrepancia (**Kubota N et al, Molecular Cell 1999; Miles PD et al, J Clin Invest 2000**). En concreto, el grupo del profesor Kadowaki defendió que el descenso en la actividad de PPAR $\gamma$  en los ratones PPAR $\gamma^{+/-}$  reduce la lipogénesis en el tejido adiposo, previene la hipertrófia del adipocito, incrementa la secreción de leptina y promueve la atenuación en la resistencia a la insulina (**Kubota N et al, Molecular Cell 1999; Yamauchi T et al, JBC 2001**). En cambio, en un estudio posterior realizado por Miles y colaboradores no se observaron mejoras en la sensibilidad a la insulina tras una DRG en los ratones PPAR $\gamma^{+/-}$  ni tras someterlos a un tratamiento con TZDs (**Miles PD et al, Am J Physiol Endocrinol Metab 2003**). En relación con el papel antiinflamatorio que ejerce PPAR $\gamma$ , estudios recientes en los ratones PPAR $\gamma^{+/-}$  han mostrado una mayor susceptibilidad a modelos experimentales de artritis y enfermedad inflamatoria intestinal (**Desreumaux P et al, J Exp Med 2001; Setoguchi K et al, JCI 2001**).

La muerte embrionaria de los ratones PPAR $\gamma^{-/-}$  fué un obstáculo para el estudio del papel completo de PPAR $\gamma$ . No obstante mediante la tecnología *Cre-loxP* se han podido desarrollar ratones KO condicionales de PPAR $\gamma$  específicos de tejido que han permitido el estudio de las funciones concretas de PPAR $\gamma$  en cada tipo celular. Además de los ratones KO específicos de tejido, en el estudio de las funciones de PPAR $\gamma$  después de la gestación se han desarrollado otros modelos murinos como los KO específico de la isoforma 2 (**Koutnikova H et al, PNAS 2003; Zhang et al, PNAS 2004; Medina-Gomez G et al, Diabetes 2005**) y ratones *knock-in* a los que se ha introducido modificaciones o mutaciones humanas descritas en el gen de PPAR $\gamma$  (**Barroso I et al, Nature 1999; Rangwala SM et al, Dev Cell 2003; Tsai et al, JCI 2004**).

Las discrepancias y controversias surgidas alrededor de las funciones de PPAR $\gamma$  y los mecanismos de acción de TZDs se han podido desentrañar a partir de la utilización de modelos murinos modificados genéticamente. De hecho, aunque durante mucho tiempo se han relacionan los

resultados a largo plazo de las TZD debido a mecanismos dependientes de la acción de PPAR $\gamma$ , a través del estudio de los modelos de KO condicionales de PPAR $\gamma$  específicos de tejido se han descrito efectos de las TZD independientes de PPAR $\gamma$  que pueden coexistir con los primeros (Duan SZ et al, Circ Res 2005; McAlpine CA et al, Int J Cancer 2006; Ivashchenko CY et al, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2007).

## 5.2- RATONES KO CONDICIONALES DE PPAR $\gamma$ ESPECÍFICOS DE CÉLULA

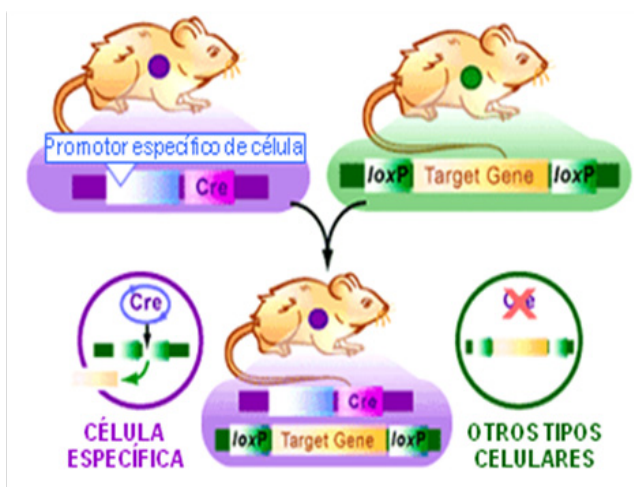


Figura 14. Estrategia de cruce en la generación de ratones KO condicionales específicos de célula (Imagen obtenida de scq.ubc.ca; Jane Wang, Ilustrador)

Tal y como se aprecia en la **Figura 14**, los ratones KO condicionales específicos de célula son generados a partir del cruce entre dos tipos de ratones transgénicos. Inicialmente se crean ratones transgénicos introduciendo 2 secuencias *loxP* que se encuentran flanqueando exones claves en el gen de interés, para generar un gen “floreado”. Se crea una

segunda cepa de ratones transgénicos que contiene el gen codificante de la enzima Cre-recombinasa unida al promotor de un gen cuya expresión es específica en un tipo celular. En los ratones KO condicionales específicos de célula, la enzima reconoce las secuencias *loxP* de 34 pares de bases y elimina por recombinación homóloga el fragmento del gen flanqueado únicamente en las células donde se activa su expresión según el promotor escogido. El ADN generado del gen de interés codifica una proteína no funcional al eliminar los exones con función crítica (Kwan KM, Genesis 2002).

En la generación de ratones KO condicionales de PPAR $\gamma$  se han utilizado dos estrategias para florear el gen de PPAR $\gamma$ . El grupo del profesor González colocó las dos secuencias alrededor del segundo exón común (E5 según NCBI/ENSEMBL) de forma que se deletionó el dominio de unión al

ADN (Akiyama TE et al, Mol Cell Biol 2002). En el presente proyecto hemos trabajado con ratones floxeados entre el primer y segundo exón común para las dos isoformas (E4 y E5 según NCBI/ENSEMBL) debido a la colaboración realizada con el profesor Barak (He et al, PNAS 2003). Hasta el momento se ha podido estudiar la función específica de PPAR $\gamma$  en una variedad de tipos celulares gracias al uso de diferentes promotores específicos para la expresión de la recombinasa Cre como se detalla en la **Tabla 4**:

**Tabla 4. Modelos de KO condicionales de PPAR $\gamma$  específicos de célula**

Tejido / célula	Promotor	Referencias
Hígado / Hepatocitos	Albúmina (Alb)	- Gravrilova O et al, JBC 2003 - Matsusue K et al, JCI 2003
Tejido adiposo / Adipocitos	FABP4 o proteína adiposa 2 (aP2)	- He et al, PNAS 2003 - Imai T et al, PNAS 2004 - Jones JR et al, PNAS 2005
Músculo / Miocitos	Creatina-muscular quinasa (MCK)	- Norris AW et al, JCI 2003 - Hevener AL et al, Nat Med 2003
Macrófagos o Células de la línea mieloide	Lisozima M (LyzM)	- Babaev VR et al, Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005 - Odegaard JI et al, Nature 2007 - Hevener AL et al, JCI 2007
Páncreas / Células $\beta$	Insulina (Ins) Pancreas duodenum homeobox-1 (PDX-1)	- Rosen ED et al, Mol Cell Biol 2003 - Welters HJ et al, Endocrinology 2012
Vasculatura / Células endoteliales y células derivadas de la médula ósea	Receptor tirosina quinasa de angiopoietina-1 (Tie2)	- Nicol CJ et al, Am J Hypertens 2005 - Wan Y et al, Genes Dev 2007 - Kanda T et al, JCI 2009 - Guignabert C et al, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2009
Células vasculares del músculo liso	Proteína de músculo liso (SM22)	- Woldt E et al, Nat Commun 2012
Corazón / Cardiomiocitos	$\alpha$ -Miosina cardíaca de cadena pesada ( $\alpha$ MHC)	Duan SZ et al, Circ Res 2005
Riñón / Células del conducto colectivo	Aquaporina 2 (Aqp2)	- Zhang H et al, PNAS 2005 - Guan Y et al, Nat Med 2005
Cerebro / Neuronas	Quinasa tipo II dependiente de Ca <sup>2+</sup> /calmodulina ( $\alpha$ CaM-KII)	Zhao X et al, J Neurosci 2009
Pulmón / Células epiteliales de las vías aéreas	Proteínas secretoras de células clara 10KDa (CC10)	Simon DM et al, FASEB J 2006
Cólon / células del epitelio intestinal	Proteína de unión actina (Villin)	- Adachi M et al, Gut 2006 - Mohapatra SK et al, Plos One 2010
Linfocitos B	Antígeno Cd19 (Cd19)	Ramon S et al, J Immune 2012
Células hematopoyéticas, y Linfocitos B y T	Virus del tumor mamario de ratón (MMTV)	- Cui Y et al, JBC 2002 - Hontecillas R et al, J Immunol 2007
Epidermis / Células epiteliales	Queratina 14 (K14)	- Mao-Qiang M et al, J Invest Dermatol 2004 - Sahu RP et al, Int J Cancer 2012



### 5.3- PPAR $\gamma$ y la EHGNA

En el hígado sano PPAR $\gamma$  se expresa de forma basal, en concreto corresponde a un 9-12% del nivel de expresión descrito en el tejido adiposo humano. (**Spiegelman BM, Diabetes 1998**) Aun así, se ha relacionado la sobreexpresión de PPAR $\gamma$  en el hígado con la esteatosis hepática. De hecho, su expresión incrementa significativamente en el hígado tanto en ratones sometidos a modelos experimentales de esteatosis hepática como en pacientes diagnosticados con hígado graso o esteatohepatitis (**Vidal-Puig AJ et al, JCI 1996; Westerbacka J et al, Diabetes 2007; Pettinelli P et al, J Clin Endocrinol Metab 2011**). Estudios previos realizados con modelos genéticos de obesidad, diabetes, sobreexpresión o delección específica de PPAR $\gamma$  en tejidos altamente metabólicos, postulan que PPAR $\gamma$  ejerce un papel modulador y causal en el desarrollo de la EHGNA debido a la acción ejercida a través de diferentes tejidos y rutas de señalización. (**Bedoucha M et al, J Hepatol 2001; Rahimian R et al, Mol Cell Biochem 2001; Yu S et al, JBC 2003; Memon RA et al, Endocrinology 2000; Bedoucha M et al, J Hepatol 2001; Garcia-Ruiz I et al, Hepatology 2007**). Efectivamente, el estudio de KO condicionales de PPAR $\gamma$  específicos en los tres principales tejidos metabólicos (tejido adiposo, hígado y músculo esquelético) ha permitido observar las alteraciones causadas en la homeostasis lipídica del organismo y en la sensibilidad a la insulina por la ausencia del receptor nuclear de forma individual.

La inactivación de las isoforma de PPAR $\gamma$  en el tejido adiposo permitió establecer el papel esencial que ejerce PPAR $\gamma$  en la adipogénesis y las consecuencias originadas en el hígado resultado de las modificaciones funcionales en el tejido adiposo (**Koutnikova et al, PNAS 2003; He et al, PNAS 2003; Jones JR et al, PNAS 2005**). Tanto el grupo del profesor Evans como el grupo del profesor Magnuson generaron KO condicionales de PPAR $\gamma$  (FKO $\gamma$ ) específicos en adipocitos maduros a través del uso del promotor del gen FABP4 o aP2. Los ratones FKO $\gamma$  mostraron lipodistrofia progresiva acompañado de hiperlipidemia debido al aumento de AGL, hígado graso y RI hepática (**He W et al, PNAS 2003**). Aunque se observaron estas alteraciones, los ratones FKO $\gamma$  presentaron

una respuesta similar a la de los ratones control frente a los test de tolerancia a la glucosa o a la insulina. El modelo experimental de DRG exacerbó la esteatosis hepática, causó hiperinsulinemia y en consecuencia mayor RI, aunque presentaron protección frente al incremento de adiposidad. Sorprendentemente el tratamiento con TZDs (rosiglitazona, 3 mg/Kg/día durante 4 semanas) no consiguió mejorar la sensibilidad a la insulina en el tejido adiposo ni disminuir los niveles de AGL en plasma debido a la ausencia de PPAR $\gamma$  en el tejido adiposo, sin embargo consiguió disminuir la RI en el músculo e hígado. En resumen la presencia de PPAR $\gamma$  en el tejido adiposo ejerce un papel importante en la adipogénesis y en la sensibilidad a la insulina en un estado de obesidad o EHGNA, siendo crucial en los mecanismos de acción de las TZDs.

PPAR $\gamma$  en el hígado se deletó específicamente a través del uso del promotor de la Albúmina que expresa la recombinasa Cre exclusivamente en los hepatocitos después del parto, originando una recombinación máxima a las 6 semanas de edad y una supresión de PPAR $\gamma$  en el hígado del 90% (el 10% restante corresponde a PPAR $\gamma$  en las células no parenquimales). El estudio de las funciones de PPAR $\gamma$  en el hígado se llevó a cabo por separado en dos modelos animales de diabetes con esteatosis hepática preexistente: los ratones *ob/ob* deficientes en el gen de la leptina o los ratones A-ZIP/F-1 que presentan lipodistrofia (**Gravrilova O et al, JBC 2003; Matsusue K et al, JCI 2003**). Gravrilova y colaboradores compararon el fenotipo mostrado por los ratones KO específicos de hepatocito (LKO) con los efectos observados en los ratones AZIP con la delección de PPAR $\gamma$  en los hepatocitos (AZIP LKO). La deficiencia de PPAR $\gamma$  en el hígado de los ratones LKO causó alteraciones en el balance lipídico debido a defectos en la eliminación de TG, hiperlipidemia e incremento de grasa corporal con la edad. En cambio la ausencia de PPAR $\gamma$  en el hígado de los dos modelos genéticos (*ob/ob* y AZIP) mejoró notablemente el hígado graso a través de la reducción del contenido hepático de TG por el descenso en genes involucrados en la lipogénesis hepática, aunque no mejoró el fenotipo metabólico ya que incrementó los niveles de AG y lipoproteínas circulantes, y originó RI en el músculo e hígado.

La administración de TZDs (rosiglitazona, 3 mg/Kg/día durante 3 semanas) en el modelo *ob/ob* exacerbó la esteatosis hepática y causó hepatomegalia pero estos efectos fueron revertidos en los ratones *ob/ob-PPAR $\gamma$ Cre* KO (**Matsusue K et al, JCI 2003**). La ausencia de PPAR $\gamma$  en el hígado de LKO no afectó a la efectividad del tratamiento con TZDs (rosiglitazona, 3 mg/Kg/ día durante 5 semanas) al estar presente en el tejido adiposo. Pero en ausencia de tejido adiposo, PPAR $\gamma$  en el hígado se convierte en la diana principal de la acción insulino-sensibilizadora de las TZDs ya que en los ratones AZIP se observó un descenso en los niveles de glucosa y TG en el plasma redistribuyéndolos hacia el hígado para su oxidación (**Gravrilova O et al, JBC 2003**). De esta forma se demostró que PPAR $\gamma$  hepático tiene un impacto mínimo en el homeostasis glucídica ya que el mayor efecto de las TZDs se produce a través de PPAR $\gamma$  en el tejido adiposo, sin embargo en ausencia de tejido adiposo, PPAR $\gamma$  en el hígado puede regular tanto la homeostasis de los carbohidratos como de los lípidos. En conjunto, se demostró la importancia que PPAR $\gamma$  en el hígado ya que ejerce un papel central en la lipogénesis hepática y en el control de la homeostasis lipídica, participando en los mecanismos de desarrollo de esteatosis hepática.

En contraste con los estudios que muestran el papel perjudicial de PPAR $\gamma$  en el hígado, otras publicaciones sugieren que la expresión de PPAR $\gamma$  en las CK y CEH puede modular tanto la inflamación como la fibrosis hepática. De hecho, la sobreexpresión de PPAR $\gamma$  en el hígado mediante adenovirus mostró mejoras a nivel de esteatosis, inflamación y fibrosis (**Nan YM et al, Scand J Gastroenterol 2011**). En el mismo estudio, el tratamiento con rosiglitazona después de la administración de la dieta DMC atenuó el desarrollo de EGHNA con fibrosis, mientras que la administración del antagonista de PPAR $\gamma$  promovió la severidad de las lesiones hepáticas. Además un estudio posterior también demostró el efecto beneficioso de la sobreexpresión de PPAR $\gamma$  también en ratones sometidos al modelo experimental de inducción de EHNA con la dieta DCM, la resolución en la fibrosis hepática se atribuyó a la reducción en la proliferación de la CEH debido a la sobreexpresión de PPAR $\gamma$  (**Yu J et al, J Biochem Cell Biol 2010**). Asimismo, el efecto preventivo de PPAR $\gamma$  en la fibrosis hepática fue confirmado en publicaciones previas realizadas en

ratas sometidas al modelo hepatotóxico por inhalación de CCl<sub>4</sub>, a la administración de agonistas de PPAR $\gamma$  que no forman parte de la familia de TZDs (GW570) o por sobreexpresión de PPAR $\gamma$  en el hígado mediante lentivirus (**Galli A et al, Gastroenterology 2002; Yang L et al, Inflamm Res 2010; Wang Z et al, Hepatobiliary Pancreat Dis Int 2011**). No obstante, el estudio publicado por Leclercq y colaboradores limitan las propiedades antifibrogénicas de la TZD pioglitazona en función del momento en que se inicia el tratamiento, el tipo de daño hepático, la severidad del estado de fibrosis, y el periodo en que se encuentra la EGHNA (**Leclercq LA et al, Gut 2006**).

Aunque la expresión de PPAR $\gamma$  en el músculo a nivel basal también es baja, el músculo esquelético ejerce un papel importante en la sensibilidad periférica a la insulina. A finales de los años 90 no se conocían los mecanismos de acción de la TZDs, por ello se realizaron dos estudios en paralelo para investigar si PPAR $\gamma$  en el músculo podía ser diana en la acción de los fármacos TZDs (**Norris AW et al, JCI 2003; Hevener AL et al, Nat Med 2003**). En ambos estudios se utilizó el mismo promotor creatina-muscular quinasa (MCK) para delecionar selectivamente PPAR $\gamma$  en los miocitos, pero el sistema de “floreado” en PPAR $\gamma$ , los tipos de cepas de ratones (con desigual respuesta metabólica), el modelo experimental utilizado (DRG versus edad) y esencialmente la diferente sensibilidad frente a las TZDs generaron resultados opuestos. Mientras que el estudio de Norris y colaboradores demostró que los ratones KO de PPAR $\gamma$  en el músculo (MuPPAR $\gamma$  KO) presentaban la misma respuesta frente las TZDs que ratones normales sometidos a la DRG, el segundo estudio realizado por Hevener y colaboradores en cambio observó que la eliminación de PPAR $\gamma$  en el músculo causó RI en el músculo y el tratamiento con TZDs no incrementó la sensibilidad a la insulina en los ratones KO. A pesar de estas discrepancias entre los estudios realizados en KO condicionales específicos de músculo, los resultados del primer estudio se encuentran en consonancia con otras publicaciones que atribuyen a PPAR $\gamma$  en el músculo la función de coordinación del uso de energía y concluyen que los efectos ejercidos por las TZDs son independientes de la presencia de PPAR $\gamma$  en este órgano (**Koutnikova H et al, PNAS 2003; He et**

al, PNAS 2003; Norris AW et al, JCI 2003; Gravrilova O et al, JBC 2003; Matsusue K et al, JCI 2003).

Por último, a raíz de diversas observaciones sobre las acciones que ejerce PPAR $\gamma$  en los macrófagos como por ejemplo la inducción de genes que regulan el flujo de lípidos (oxLDL) a través de la acción de TZDs, la supresión de la expresión de genes proinflamatorios o su intervención en la reducción de lesiones ateroscleróticas, por lo que descifrar sus funciones concretas promovió la creación de ratones deficientes de PPAR $\gamma$  en macrófagos (**Tontonoz P et al, Cell 1998; Ricote M et al, Nature 1998; Li AC et al, JCI 2000**). La expresión de la recombinasa Cre se realizó a través de la utilización del promotor del gen de la Lisozima M (LysM). De esta forma se delecta PPAR $\gamma$  en un 83-98% en monocitos y macrófagos maduros, aunque también en otras células de la línea mieloide como los granulocitos (neutrófilos, esoinófilos y basófilos) (**Clausen BE et al, Transgenic Res 1999**). Dos estudios publicados el 2007 demostraron que la eliminación de PPAR $\gamma$  en los macrófagos (Mac-PPAR $\gamma$  KO) causa intolerancia a la glucosa en músculo esquelético, RI hepática y alteraciones en las vías de señalización de la insulina en tejido adiposo, músculo e hígado (**Hevener AL et al, JCI 2007; Odegaard JI et al, Nature 2007**). En ambos estudios, los ratones Mac-PPAR $\gamma$  KO específicos de macrófagos tras someterlos a un modelo de obesidad e EHGNA por DRG mostraron RI sistémica severa. En el estudio realizado por Hevener y colaboradores, los ratones respondieron de forma parcial a los efectos insulino sensibilizantes de las TZDs. De forma inesperada, Odegaard y colaboradores no observaron alteraciones en el contenido hepático de TG ni esteatosis hepática en el modelo de Mac-PPAR $\gamma$  KO, pero demostraron que PPAR $\gamma$  es necesario para la maduración de los macrófagos alternativamente activados o M2 en el tejido adiposo. En conjunto, PPAR $\gamma$  en macrófago es esencial para el mantenimiento de la sensibilidad a la insulina global mediando la acción de las TZDs, y ejerce control en la polarización M1/M2 de los macrófagos.

## VI- LAS TIAZOLIDINEDIONAS (TZDs)

Las TZDs, comúnmente conocidas como glitazonas, son agonistas sintéticos de PPAR $\gamma$  que actúan como fármacos sensibilizantes frente a la insulina. Las TZDs mejoran el control glicémico de forma eficiente en pacientes con DM tipo II (mejoran la sensibilidad durante los clamps hiperinsulinémicos-euglicémicos) y debido a sus acciones frente la RI también son candidatos en el tratamiento de la EHNA (**Nolan JJ et al, N Engl J Med 1994; Tiikkainen M et al, Diabetes 2004; Miyazaki Y et al, Clin Endocrinol Metab 2002; Ratziu V et al, Hepatology 2010**). Además de la diabetes y la EHNA, la administración de TZDs junto con otros agonistas de PPAR $\gamma$  se encuentra en fase de estudio para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo como enfermedades vasculares, Parkinson, Alzheimer o Huntington (**Polvani S et al, PPAR Research 2012**).

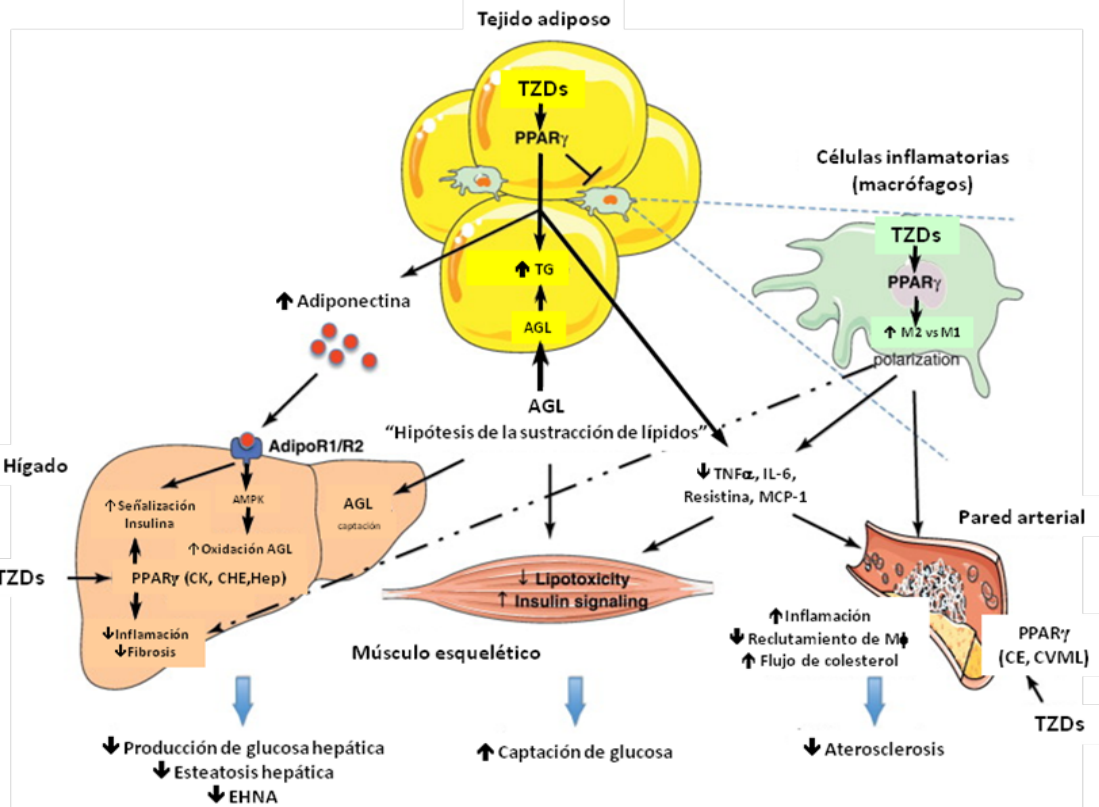
### 6.1- MECANISMOS DE LAS TZDs

El efecto protector en el daño hepático observado tras un tratamiento con TZDs puede ser consecuencia de las modificaciones metabólicas producidas por la activación de PPAR $\gamma$  principalmente en el tejido adiposo, ya que el hígado no es el blanco directo de las glitazonas en humanos.

En los pasados años a partir de la utilización de modelos de KO condicional específicos de tejido se han podido esclarecer los mecanismos biológicos que describen la activación de PPAR $\gamma$  específicamente en el tejido adiposo por las glitazonas y, como consecuencia, el aumento de sensibilidad a la insulina (**Figura 15**). En primer lugar, las TZDs no incrementan el tamaño de los adipocitos, si no que promueven la diferenciación de los preadipocitos hacia adipocitos de menor tamaño con mayor sensibilidad a la insulina. Las TZDs disminuyen los niveles de TG y AGL en plasma incrementando su catabolismo induciendo la expresión del gen de la lipoproteína lipasa en el tejido adiposo (**Chinetti G et al, Inflamm res 2000**). Otro mecanismo que contribuye en la mejora de la sensibilidad global a la insulina es la acción que realiza PPAR $\gamma$  en el tejido adiposo

modulando la producción y secreción de adipocinas que influyen de forma autocrina, paracrina o endocrina. Las TZDs incrementan la secreción de adiponectina (al ser un gen diana de PPAR $\gamma$ ) que juega un papel central en la sensibilidad a la insulina a través de la activación de la proteína quinasa activada por AMPc (AMPK) (Yu JG et al, *Diabetes* 2002; Nawrocki AR et al, *JBC* 2006). Así mismo la activación de PPAR $\gamma$  por las TZDs disminuye la producción de citoquinas asociadas con la RI (TNF $\alpha$ , IL-6, MCP-1 y resistina). Como se ha descrito anteriormente (Apartado 5.3.), PPAR $\gamma$  realiza un papel antiinflamatorio en macrófagos, por lo que su activación a través de las TZDs afecta los macrófagos residentes y reclutados en el tejido adiposo durante la RI de forma que atenúa su activación. Odegaard y colaboradores demostraron la acción que realiza PPAR $\gamma$  sobre los macrófagos clásicamente activados o M1 promoviendo la polarización hacia el estado de activación alternativa o M2 y reduciendo la infiltración de macrófagos al tejido adiposo. Esta función también ha sido descrita en monocitos humanos; además el grupo de Ricote describió la polarización hacia M2 de los macrófagos del tejido adiposo como consecuencia de la administración de rosiglitazona en ratones obesos. Las TZDs también reducen la aterosclerosis interaccionando con la acción de PPAR $\gamma$  en los macrófagos, las células endoteliales y las células vasculares del músculo liso (Semple RK et al, *J Clin Invest* 2006; Odegaard JI et al, *Nature* 2007; Hevener AL et al, *JCI* 2007; Bouhlel MA et al, *Cell Metab* 2007).

En conjunto, las TZDs realizan un efecto esencial en los adipocitos donde dirigen la repartición y redistribución de lípidos desde los tejidos periféricos como el hígado y el músculo, e incrementan su almacenamiento en el tejido adiposo subcutáneo. De esta forma, reducen la lipotoxicidad intracelular y la polarización de los macrófagos a M1 producida por la acumulación de grasa en el hígado y músculo provocando una normalización en las vías de señalización de la insulina. En consecuencia, la administración de TZDs mejora la sensibilidad a la insulina en el músculo y reduce la esteatosis hepática de forma indirecta (Tontonoz P and Spiegelman BM, *Annu Rev Biochem* 2008; Ratzliff V et al, *Hepatology* 2010; Cariou B et al, *Trends Endocrinol Metab.* 2012).



**Figura 15. Mecanismos de acción de las TZDs.** Abreviaciones: AGL, ácidos grasos libres; AMPK, proteína quinasa activa por monofosfato de adenina; CE, célula endotelial; CHE, célula hepática estrellada; CK, célula de Kupffer; CVML, célula vasculares del músculo liso; M $\phi$ , macrófagos; TG, triacilglicéridos; (Figura adaptada de Cariou B et al, Trends Endocrinol Metab. 2012)

## 6.2. LA ACCIÓN DE LAS TZDs EN LOS HUMANOS

De la familia de las glitazonas destacan tres fármacos para el tratamiento de pacientes con diabetes tipo II debido a su uso aprobado en Estados Unidos, los cuales se clasifican según su afinidad de unión a PPAR $\gamma$  desde moderada (troglitazona), intermedia (piaglitazona) o elevada (rosiglitazona).

Ensayos aleatorios y controlados con rosiglitazona o pioglitazona, tanto en pacientes diabéticos como sin diabetes tipo II pero con EHGNA diagnosticado por biopsia, indican efectos variables de las glitazonas en el hígado. Estos estudios han demostrado que la administración de glitazonas a corto o medio plazo (6 a 12 meses) mejoran la resistencia frente a la insulina, producen un descenso en los niveles circulantes de transaminasas y demuestran de forma convincente una mejora en la esteatosis hepática evaluado por resonancia magnética (Lutchman G et al, Clin Gastroenterol Hepatol 2006; Belfort R et al, N Engl J Med 2006; Ratziu V et al, Gastroenterology



**2008; Ratziu V et al, Hepatology 2010**). Muchos de los estudios clínicos realizados, además de demostrar mejoras en el hígado graso, presentan descenso en la inflamación o el daño celular pero sin efectos a nivel de fibrosis. En concreto, dos ensayos realizados con pioglitazona en pacientes con diabetes tipo II o sin diabetes, pero con diagnóstico de EHNA por biopsia, condujeron a una clara mejora hepática a nivel metabólico (tolerancia frente a la glucosa) e histológico (esteatosis e inflamación) pero en ningún caso se observaron efectos en la fibrosis (**Belfort R et al, N Engl J Med 2006; Sanyal AJ et al, N Engl J Med 2006**). A pesar de estas evidencias, un solo estudio ha demostrado reducción en daño hepatocelular, cuerpos de Mallory y fibrosis en pacientes no-diabéticos con EHNA sometidos a un tratamiento de corta duración con pioglitazona (1 año) (**Aithal GP et al, Gastroenterology 2008**). Es posible que la corrección en los niveles de transaminasas acompañado de la reducción de esteatosis hepática en pacientes con EHNA sea una consecuencia de la mejora en la sensibilidad frente a la insulina, por lo que corregir la RI no sea suficiente para reducir la inflamación y en concreto la fibrosis. Por otro lado, la existencia de estudios in vitro y en modelos animales sobre el efecto antiinflamatorio y antifibrótico de las glitazonas argumentan a favor de su uso en terapias de larga duración, aunque existen argumentos contrarios a su eficacia una vez la fibrosis se encuentra establecida (**Marra F et al, Gastroenterology 2000; Galli A et al, Gastroenterology 2002; Leclercq IA et al, Gut 2006**). En concreto, un artículo publicado recientemente en Journal of Hepatology concluye a partir de un meta-análisis que pioglitazona puede realizar un papel antifibrogénico y reducir la degeneración hidrópica de forma modesta en tratamientos de larga duración, aunque siempre valorando el coste cardiovascular y de aumento de peso que producen los efectos secundarios (**Mahady SE et al, J Hepatol 2011**). En conclusión, los efectos que pueden ejercer las glitazonas para contrarrestar el daño hepático de la EHNA son confusos.

### 6.3. EFECTOS SECUNDARIOS DE LAS TZDs

Los tratamientos con TZDs suponen un reto en la práctica clínica ya que conllevan una serie de efectos secundarios como el incremento significativo de peso corporal y la retención de fluidos que puede precipitar al fallo cardíaco y a la fractura ósea (**Zhang H et al, PNAS 2005; Guan Y et al, Nat Med 2005; Betteridge DJ et al, Diabet Med 2011**). Tanto troglitazona como rosiglitazona han sido retirados del mercado debido al incremento de incidentes por hepatotoxicidad y riesgo cardiovascular respectivamente (**Shibuya A et al, Diabetes Care, 1998; Nissen et al, N Engl J Med 2007**). El ensayo clínico realizado por Ratziu y colaboradores en el que se evaluó la eficacia de los tratamientos prolongados con glitazona (2 años) cuestionó la eficacia de tratamiento de estos fármacos para la EHNA respecto el riesgo de efectos secundarios. Debido a que los estudios realizados hasta el momento comprendían tratamientos a corto plazo que originaban resultados histológicos controvertidos, en el artículo publicado en *Hepatology* argumentan a favor de tratamientos prolongados con rosiglitazona. En el estudio se produce el descenso de las transaminasas hepáticas y la esteatosis hepática y la sensibilidad frente a la insulina. De todas formas, las glitazonas requieren medidas de seguridad debido a los efectos secundarios por ello consideran que las variables riesgo/beneficio de los tratamientos extendidos tienen que evaluarse cuidadosamente (**Ratziu V et al, Hepatology 2010**). Por su parte, pioglitazona continua siendo efectiva y utilizada como fármaco antidiabético pero su seguridad clínica se está cuestionando debido al aparente incremento en el riesgo de sufrir cáncer de vejiga (**Lewis JD et al, Diabetes Care 2011**).

## **OBJETIVOS**

---



El receptor nuclear PPAR $\gamma$  controla y regula variedad de procesos biológicos como la adipogénesis, respuestas inflamatorias, y la homeostasis de los carbohidratos y lípidos.

En relación con la EHGNA, el aumento de expresión de PPAR $\gamma$  es una característica general de la esteatosis hepática demostrada tanto en estudios clínicos como en experimentales. Además, la sobreexpresión hepática del receptor nuclear parece estar relacionada con la acumulación de TG hepáticos y la activación de genes lipogénicos e involucrados en la síntesis de lípidos *de novo*. Aunque se ha demostrado que la administración de TZDs mejora la esteatosis hepática en pacientes con EHGNA, existen resultados contradictorios en modelos experimentales de obesidad y diabetes así como en líneas celulares de hepatocitos con sobreexpresión de PPAR $\gamma$ . Por tanto, la contribución que ejerce PPAR $\gamma$  en el desarrollo del hígado graso es controvertida en relación a si su acción puede agravar la patología o ser consecuencia de la misma.

En el contexto de la inflamación y fibrosis hepática no se ha establecido el papel que ejerce PPAR $\gamma$ . En un estudio realizado por nuestro grupo se demostró que el inhibidor selectivo de la ciclooxigenasa (COX2) reduce la fibrosis hepática a través de la activación de PPAR $\gamma$ . Así mismo, se han descrito las funciones antiinflamatorias que puede ejercer PPAR $\gamma$  modulando el estado de activación de los macrófagos y contribuyendo de forma positiva en el metabolismo lipídico. Por otro lado, múltiples publicaciones demuestran que la recuperación de la expresión de PPAR $\gamma$  en las CEH revierte el estado de activación característico de la fibrosis hacia el de quiescencia. En línea con la activación de PPAR $\gamma$ , se ha demostrado que la administración de TZDs en modelos animales reduce la respuesta fibrogénica temprana. No obstante, otros estudios realizados muestran resultados opuestos considerando que las acciones antiinflamatorias de las TZDs pueden ser limitadas en el eje de inflamación/fibrosis, no aplicables para todas las fases de la EHGNA y actuar de forma independiente a la activación de PPAR $\gamma$ . Debido que a PPAR $\gamma$  se le han atribuido funciones controvertidas y no se han podido definir sus funciones exactas en los estadios de la enfermedad hepática, el objetivo principal de la presente tesis fue **determinar**

**cómo contribuye la expresión de PPAR $\gamma$  de las células del parénquima y sinusoide hepático en la patogénesis de la EHGNA.**

Objetivo Estudio I: Estudiar del papel de PPAR $\gamma$  en el desarrollo de la esteatosis hepática.

Objetivos específicos:

- I. Determinar si la eliminación de PPAR $\gamma$  específicamente en hepatocitos o macrófagos ejerce efectos sobre la esteatosis hepática en ratones sometidos a un modelo de obesidad inducido por DRG.
- II. Analizar si la deficiencia de PPAR $\gamma$  en hepatocitos o macrófagos afecta la expresión de genes relacionados con la inflamación, el metabolismo lipídico o glucídico en el hígado graso.
- III. Analizar si la ausencia de PPAR $\gamma$  en hepatocitos o macrófagos afecta la homeostasis de carbohidratos y la sensibilidad a la insulina en el hígado graso.
- IV. Estudiar los efectos de la delección, activación e inhibición farmacológica de PPAR $\gamma$  en modelos de esteatosis hepática *in vitro*.

Objetivo Estudio II: Determinar el papel de PPAR $\gamma$  en la respuesta inflamatoria y fibrogénica frente al daño hepático. Objetivos específicos:

- I. Estudiar el efecto sobre la inflamación y fibrosis hepática debido a la eliminación del gen de PPAR $\gamma$  específicamente en hepatocitos, macrófagos o CEH después de someter los ratones a un modelo de daño crónico inducido por CCl<sub>4</sub>.
- II. Determinar si la deficiencia de PPAR $\gamma$  específicamente en hepatocitos o macrófagos previene o exacerba la respuesta inflamatoria frente a un daño hepático agudo por CCl<sub>4</sub>.
- III. Analizar *in vitro* el grado de respuesta inflamatoria frente a la eliminación de PPAR $\gamma$  en los macrófagos en ausencia o presencia del efecto de TZD.

## **RESULTADOS**

---





## **ARTÍCULO 1**

### **“Papel de PPAR $\gamma$ en la esteatosis hepática inducida por obesidad mediante el uso de ratones KO condicionales específicos de hepatocito y macrófago”**

Morán-Salvador E et al, *FASEB J* 25:2538-50, 2011.

Los ratones KO condicionales de PPAR $\gamma$  específicos de hepatocitos y macrófago muestran leves cambios fenotípicos en condiciones basales (Figura 1 y Tabla 1 del Artículo 1).

La delección específica del gen de PPAR $\gamma$  en los hepatocitos o en macrófagos se realizó a través de la tecnología Cre-*loxP*. De esta forma, ratones floxeados en los dos alelos del gen de PPAR $\gamma$  por las secuencias *loxP* (flanqueando el primer y segundo exón común para las dos isoformas, E4 y E5 según NCBI/ENSEMBL) fueron cruzados con ratones transgénicos que expresan la recombinasa Cre bajo el control del promotor de la albúmina o lisozima M, respectivamente (Fig 1A). De esta forma los ratones KO condicionales pierden parcialmente el motivo AF1 y el primer motivo dedo de zinc del dominio de unión al ADN en el extremo N-terminal de PPAR $\gamma$ 1 y PPAR $\gamma$ 2 (además del extremo no funcional de 43 aminoácidos de esta última isoforma).

La inactivación de PPAR $\gamma$  en los hepatocitos causa un fenotipo leve, caracterizado por el incremento de peso corporal y del hígado, y el descenso en los niveles séricos de AST comparado con los ratones control (ratones homocigotos floxeados en PPAR $\gamma$ ). En cambio, la delección de PPAR $\gamma$  en los macrófagos reduce los niveles séricos de colesterol pero incrementa la concentración de glucosa circulante, induce intolerancia moderada a la glucosa, y además, aumenta moderadamente ALT pero sin afectar el peso corporal ni el del hígado (Fig 1 B-J).

Para conocer el efecto de la delección de PPAR $\gamma$  en las diferentes células del hígado, evaluamos la expresión de genes hepáticos diana de PPAR $\gamma$ . Sólo se observó un descenso en el gen lipogénico LPL sin cambios en la expresión de genes involucrados en el transporte de AG, lipogénesis, oxidación de AG, metabolismo de la glucosa e inflamación en ratones KO específicos de hepatocito. A su vez, la inactivación de PPAR $\gamma$  en macrófagos aumentó significativamente la expresión de genes lipogénicos (ACC y FASN) y gluconeogénicos (Fbp1 y G6Pc) (Tabla 1).

La esteatosis hepática provocada por el modelo experimental de obesidad induce la expresión de PPAR $\gamma$  en el hígado (Figura 2 del Artículo 1)

Después de 12 semanas en el modelo de dieta rica en grasa (DRG), los ratones desarrollan un aumento de adiposidad caracterizado por el incremento significativo en el aumento de peso corporal, peso del tejido adiposo, hipercolesterolemia, hiperglucemia, hiperinsulinemia e intolerancia a la glucosa. En el modelo experimental de obesidad inducido por DRG se observó un incremento del área teñida con Oil Red-O y del número de focos inflamatorios en el hígado del grupo control, indicativo de avanzada esteatosis e inflamación hepática (Fig 2A-H).

En paralelo al fenotipo hepático descrito, se observó la sobreexpresión de PPAR $\gamma$  en el hígado, tanto a nivel de expresión génica como de proteína (Fig 2 I y J).

La eliminación selectiva de PPAR $\gamma$  en el hepatocito protege a los ratones frente a la esteatosis hepática (Tabla 2 y Figura 3 del Artículo 1)

Se examinó los efectos fisiológicos y hepáticos del modelo experimental de obesidad inducido por DRG en los ratones KO condicionales de PPAR $\gamma$  específicos de hepatocito o macrófago. La pérdida de expresión de PPAR $\gamma$  en hepatocito o macrófago tras la DRG no afectó de forma importante el peso corporal, peso del hígado o peso del tejido adiposo. No obstante se observó un aumento significativo en los niveles séricos de AGL, TG y ALT en los ratones con la delección específica de PPAR $\gamma$  en macrófago (Tabla 2).

La eliminación selectiva de PPAR $\gamma$  en hepatocito protege a los ratones frente a la esteatosis ya que el contenido hepático de lípidos (demostrado por la tinción de Oil Red-O) disminuye significativamente comparado con los ratones control. Por otra parte, también se observó una disminución del contenido lipídico en el hígado del grupo KO específico de macrófago, aunque el nivel de protección frente al daño hepático fue inferior. No se observaron diferencias en la inflamación hepática entre los tres grupos sometidos a la DRG (Fig 3 A, D y E).

Estos resultados sugieren que la célula implicada en el papel proestético de PPAR $\gamma$  es el hepatocito. De hecho mediante PCR convencional y PCR a tiempo real observamos que la expresión de PPAR $\gamma$  en el hígado predomina principalmente en el hepatocito y es completamente ausente en el hígado de los ratones KO de PPAR $\gamma$  específicos de hepatocito (Fig 3 B y C).

Cultivos organotípicos de cortes de alta precisión de hígado y cultivos primarios de hepatocitos confirman el papel proesteatótico de PPAR $\gamma$  en el hepatocito (Figura 4 y 5 del Artículo 1)

Realizamos cultivos organotípicos de hígado tratados con ácido oleico (200  $\mu$ M) en un medio hiperglucémico (25 mM de Glucosa y 1.5% de BSA libre de AG en medio E-Williams) para reproducir *in vitro* la esteatosis hepática y corroborar la función proesteatótica de PPAR $\gamma$  en el hepatocito (Fig 4A y 5A).

La activación de PPAR $\gamma$  por el agonista rosiglitazona (10  $\mu$ M) aumentó la acumulación de lípidos neutros en cortes de alta precisión de hígado (tinción por Oil Red-O), pero sin afectar la actividad ALT (Fig 4B). Un efecto similar se observó en cultivos primarios de hepatocitos control incubados con rosiglitazona, en ausencia o presencia de ácido oleico (Fig 5A). Por otra parte, la incubación con el antagonista de PPAR $\gamma$  BADGE (10  $\mu$ M) en los hepatocitos aislados de ratones control reduce de forma significativa la tinción de Oil Red-O (Fig 5B).

En consecuencia, los efectos esteatogénicos y las respuestas de daño hepático frente al estímulo de ácido oleico fueron mitigadas en cultivos organotípicos de hígado y hepatocitos aislados de ratones KO de PPAR $\gamma$  específicos de hepatocito, en ausencia o presencia del agonista rosiglitazona (Fig 4C, 5C y 5D). Las respuestas esteatogénicas al ácido oleico con el agonista rosiglitazona se mantuvieron intactas en los cultivos organotípicos de hígado de ratones deficientes en PPAR $\gamma$  específicamente en los macrófagos residentes del hígado, en concreto las células de Kupffer (Fig 4D).

La ausencia de PPAR $\gamma$  en el hepatocito reprime y modula la expresión de genes del metabolismo lipídico hepático (Figura 6 del Artículo 1)

Seguidamente, para comprender los mecanismos moleculares que explican la función pro-esteatótica de PPAR $\gamma$  en el hígado se evaluaron los cambios a nivel de expresión génica en proteínas involucrados en el metabolismo lipídico hepático en el hígado de los ratones sometidos al modelo de DRG.

La deleción de PPAR $\gamma$  en el hepatocito reduce la expresión de genes que regulan la lipogénesis hepática (SREBP-1c, SCD1 Y ACC), la captación y transporte de lípidos hepáticos (FAT/CD36, L-FABP y MTT) y la oxidación de los AG (PPAR $\alpha$  y ACO) respecto los animales control (Fig 6 A y B). La eliminación selectiva de PPAR $\gamma$  en el macrófago no modificó la expresión de los genes analizados (Fig 6).

Los ratones deficientes en PPAR $\gamma$  específicamente en el hepatocito metabolizan la glucosa de forma más eficiente (Figura 7 del Artículo 1)

Así mismo se evaluó los efectos de la deleción específica celular de PPAR $\gamma$  en el hígado sobre la homeostasis glucídica en el modelo experimental de esteatosis inducido por obesidad.

Los ratones deficientes específicamente en el hepatocito tras someterlos a la DRG eliminan la glucosa circulante de forma más eficiente al mostrar una tolerancia a la glucosa mayor y presentar un descenso en los niveles circulantes de glucosa respecto los animales control (Fig 7 A y B). Estos cambios se asociaron al descenso significativo en la expresión hepática del transportador de glucosa GLUT-2 y la represión en PEPCK, enzima involucrada en la gluconeogénesis. No se observaron diferencias en otros marcadores involucrados en la vía de la gluconeogénesis (como AMP cíclico, la fosforilación de CREB o las enzimas Pcx, Fbp1 y G6Pc) (Fig 7 C-I). Tampoco se observaron cambios en la sensibilidad a la insulina en el hígado, músculo y tejido adiposo entre los tres grupos sometidos a la DRG (Fig J y K). No se observaron diferencias en la tolerancia frente la glucosa o insulina en los ratones deficientes específicamente en el macrófago (Fig 7).

## Role for PPAR $\gamma$ in obesity-induced hepatic steatosis as determined by hepatocyte- and macrophage-specific conditional knockouts

Eva Morán-Salvador,\* Marta López-Parra,\* Verónica García-Alonso,\* Esther Titos,\*\*<sup>‡</sup> Marcos Martínez-Clemente,\* Ana González-Pérez,\*\*<sup>‡</sup> Cristina López-Vicario,\* Yaacov Barak,<sup>§</sup> Vicente Arroyo,<sup>†,‡</sup> and Joan Clària\*\*<sup>‡,1</sup>

\*Department of Biochemistry and Molecular Genetics, <sup>†</sup>Liver Unit and <sup>‡</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red en el Área Temática de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Hospital Clínic, Esther Koplowitz Center–Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Barcelona, Spain; and <sup>§</sup>Department of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Sciences, Magee-Womens Research Institute, University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pennsylvania, USA

**ABSTRACT** Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\gamma$  is a nuclear receptor central to glucose and lipid homeostasis. PPAR $\gamma$  role in nonalcoholic fatty liver disease is controversial because PPAR $\gamma$  overexpression is a general property of steatotic livers, but its activation by thiazolidinediones reduces hepatic steatosis. Here, we investigated hepatic PPAR $\gamma$  function by using Cre-*loxP* technology to generate hepatocyte (PPAR $\gamma^{\Delta\text{hep}}$ )- and macrophage (PPAR $\gamma^{\Delta\text{mac}}$ )-specific PPAR $\gamma$ -knockout mice. Targeted deletion of PPAR $\gamma$  in hepatocytes, and to a lesser extent in macrophages, protected mice against high-fat diet-induced hepatic steatosis. Down-regulated expression of genes involved in lipogenesis (SCD1, SREBP-1c, and ACC), lipid transport (CD36/FAT, L-FABP, and MTP), and  $\beta$ -oxidation (PPAR $\alpha$  and ACO) was observed in PPAR $\gamma^{\Delta\text{hep}}$  mice. Moreover, PPAR $\gamma^{\Delta\text{hep}}$  mice showed improved glucose tolerance and reduced PEPCK expression without changes in Pcx, Fbp1, and G6Pc expression and CREB and JNK phosphorylation. In precision-cut liver slices (PCLSs) and hepatocytes, rosiglitazone either alone or in combination with oleic acid increased triglyceride accumulation, an effect that was blocked by the PPAR $\gamma$  antagonist biphenol A diglycidyl ether (BADGE). PCLSs and hepatocytes from PPAR $\gamma^{\Delta\text{hep}}$  mice showed blunted responses to rosiglitazone and oleic acid, whereas the response to these compounds remained intact in PCLSs from PPAR $\gamma^{\Delta\text{mac}}$  mice. Collectively, these findings establish PPAR $\gamma$  expression in hepatocytes as a prosteatotic factor in fatty liver disease.—Morán-Salvador, E., López-Parra, M., García-Alonso, V., Titos, E., Martínez-Clemente, M., González-Pérez, A., López-Vicario, C., Barak, Y., Arroyo, V., Clària, J. Role for PPAR $\gamma$  in obesity-induced hepatic steatosis as determined by hepatocyte- and macrophage-specific conditional knockouts. *FASEB J.* 25, 2538–2550 (2011). [www.fasebj.org](http://www.fasebj.org)

**Key Words:** nuclear receptors • liver cells • nonalcoholic fatty liver disease

PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED receptor (PPAR)  $\gamma$  is a member of the nuclear hormone receptor superfamily (1). It can be activated by a variety of ligands, including endogenous molecules, such as fatty acids and eicosanoids, as well as synthetic ligands such as thiazolidinediones (TZDs), antidiabetic agents that act by increasing insulin sensitivity (2–4). After ligand binding, PPAR $\gamma$  heterodimerizes with retinoid X receptor  $\alpha$  and activates genes involved in lipid storage and metabolism, particularly in tissues where the receptor is abundantly expressed, such as adipose tissue (2–4). PPAR $\gamma$  is also implicated in a wide range of biological processes, including regulation of glucose homeostasis, adipogenesis, and inflammation (2–4).

Nonalcoholic hepatic steatosis, or fatty liver, is the abnormal accumulation of triglycerides in the cytoplasm of hepatocytes (5). Hepatic steatosis is no longer regarded as a neutral and innocent bystander but rather as a premorbid condition, which increases the vulnerability of this organ to progress to steatohepatitis and to more advanced stages of liver disease (5). In contrast to healthy livers, up-regulation of PPAR $\gamma$  expression is a general property of steatotic livers (6–10). Consistent with these findings, hepatic PPAR $\gamma$  overexpression has been linked to exacerbated steatosis by mechanisms involving activation of lipogenic genes and *de novo* lipogenesis and increased hepatic triglyceride concentrations (11–14). Moreover, hepatocytes exposed to TZDs show increased lipid stores (15). Conversely, liver-specific knockout of PPAR $\gamma$  in either lipotrophic or obese *ob/ob* mice results in decreased hepatic lipid accumulation and reduced expression of several genes important to lipid metabolism (12, 13). Similar

<sup>1</sup> Correspondence: Department of Biochemistry and Molecular Genetics, Hospital Clínic, Villarroel 170, Barcelona 08036, Spain. E-mail: [jclaria@clinic.ub.es](mailto:jclaria@clinic.ub.es)

doi: 10.1096/fj.10-173716

This article includes supplemental data. Please visit <http://www.fasebj.org> to obtain this information.

findings have been reported after i.p. injections of PPAR $\gamma$  antisense oligonucleotides to apoB/BATless mice, a genetic model of hyperlipidemia, insulin resistance, and hepatic steatosis (14). Finally, administration of TZDs improves hepatic steatosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), possibly by its primary insulin-sensitizing effect on adipose tissue (16, 17). In contrast, prolonged TZD treatment of obese KKA $^y$  mice, which express high levels of PPAR $\gamma$  in the liver, results in severe hepatic steatosis, suggesting that administration of these drugs to individuals with altered hepatic expression of PPAR $\gamma$  may exert detrimental effects in hepatic lipid metabolism and energy balance leading to steatosis (7). Collectively, these findings indicate that the precise role of PPAR $\gamma$  in liver cells, its contribution to the maintenance of a steatotic phenotype, and whether PPAR $\gamma$  is either a causal factor or a consequence of steatosis, are still controversial.

The aim of the current study was to examine the relative contribution to the pathogenesis of hepatic steatosis of PPAR $\gamma$  expression in both parenchymal and nonparenchymal liver cells. Specifically, we used the Cre-*loxP* cell type-specific gene-knockout technology to inactivate PPAR $\gamma$  in two cell types recognized as causal factors in hepatic insulin resistance and steatosis, namely hepatocytes, the parenchymal cell type predominantly abundant in the liver, and macrophages, represented in the liver as Kupffer cells, one of the most biologically relevant nonparenchymal cell types in the liver (18–21). This report provides comparative data on the role of PPAR $\gamma$  expression in these two cell types in the dietary model of high-fat-diet (HFD)-induced NAFLD.

## MATERIALS AND METHODS

### Experimental studies

Mice carrying the *loxP*-targeted PPAR $\gamma$  gene (PPAR $\gamma^{f/f}$ ) were created as described previously and crossed to transgenic mice expressing Cre recombinase under the control of either the albumin (Alb) promoter or the myeloid-specific lysozyme M (LysM) promoter to yield mice with specific targeted deletion of PPAR $\gamma$  in hepatocytes (PPAR $\gamma^{f/f}$  Alb-Cre, PPAR $\gamma^{\Delta hep}$ ) or macrophages (PPAR $\gamma^{f/f}$  LysM-Cre, PPAR $\gamma^{\Delta mac}$ ), respectively (22–24). Mice were housed on wood-chip bedding cages with a humidity level of 50–60% and a 12-h light-dark cycle. Genomic DNA from mouse tail was isolated using the Omni-Pure Tissue Genomic DNA Purification System (Gene Link, Hawthorne, NY, USA) following the manufacturer's protocol with slight modifications. Mice were genotyped by a multiplex PCR, which was performed in a total of 20  $\mu$ l containing 1  $\mu$ l of tail DNA, 8  $\mu$ l of primers (see Supplemental Table S1) and 10  $\mu$ l of 5 Prime MasterMix (2.5 $\times$ ; 5 Prime, Hamburg, Germany). At the end of the experimental procedures, some mice were also genotyped by PCR using 1  $\mu$ l of liver DNA. PCR samples were amplified at 94°C (30 s), 60°C (30 s), and 71.5°C (90 s) for 40 cycles. PCR products were analyzed by electrophoresis in 2.5% LM Sieve agarose gels (Laboratorios Conda, Madrid, Spain) and visualized by ethidium bromide staining, using a 100-bp DNA ladder marker (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Animals used in the study were F2 or subsequent generations

of age-matched littermates. Male mice were fed either standard rodent chow diet (13% kcal from fat; Harlan Teklad, Madison, WI, USA) or an HFD (60% kcal from fat; Harlan Teklad) for 12 wk, starting at 8 wk of age. At the end of the study, mice were euthanized under ketamine/xylazine (4:1) anesthesia *via* i.p. injection (Ketolar; Parke Davis-Pfizer, Dublin, Ireland; and Rompun; Bayer, Leverkusen, Germany); blood was collected, and serum was obtained by centrifugation at 3000 g for 10 min. Liver was excised, rinsed in DPBS, fixed in 10% formalin, and embedded in paraffin. A portion of liver tissue was placed in optimal cutting temperature (OCT) compound (Sakura Finetek, Tokyo, Japan), immersed in cold 2-methylbutane on dry ice, and kept at  $-80^{\circ}\text{C}$ . In addition, portions of adipose, muscle, and liver tissues were snap-frozen in liquid nitrogen for further analysis. All animal studies were conducted in accordance with the criteria of the Investigation and Ethics Committee of the Hospital Clínic and the European Community laws governing the use of experimental animals.

### Glucose tolerance test (GTT) and insulin tolerance test (ITT)

To perform the GTT, mice were denied food for 6 h before receiving an i.p. injection of 20% glucose (2 g/kg bw; Sigma, St. Louis, MO, USA), and blood samples were collected from the tail 0, 5, 15, 22.5, 30, 45, 60, and 90 min later for serum glucose determination using the Accu-Chek Aviva system (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). To perform the ITT, mice were denied food for 2 h before receiving an i.p. injection of recombinant insulin (0.75 U/kg; Sigma), and blood samples were collected from the tail 0, 5, 15, 30, 45, and 60 later, and serum glucose was assessed as described previously.

### Histological analysis

Liver tissue samples fixed in 10% formalin and embedded in paraffin were cut into 5- $\mu$ m sections and stained with hematoxylin and eosin (H&E). Lobular inflammatory activity was analyzed by a registered pathologist unaware of the treatments and expressed as number of inflammatory foci per field, counting a median of 15 fields/slide at  $\times 200$ . Hepatic steatosis was assessed by Oil Red-O staining in OCT-embedded samples. 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  $\times 200$ , and relative areas of steatosis (expressed as percentage of area stained with Oil Red-O) 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.

### Biochemical analysis

Serum cholesterol, triglycerides, and feeding glucose concentrations, as well as alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activities, were determined by standard laboratory procedures. Serum insulin and free fatty acid (FFA) levels were determined using the Ultrasensitive Mouse Insulin ELISA kit (Merckodia, Uppsala, Sweden) and the HR Series NEFA-HR(2) kit (Wako Chemicals, Richmond, VA, USA), respectively.



## Precision-cut liver slices

Twenty-week-old control (PPAR $\gamma^{F/F}$ ;  $n=4$ ), PPAR $\gamma^{\Delta hep}$  ( $n=3$ ) and PPAR $\gamma^{\Delta mac}$  ( $n=3$ ) mice were anesthetized with ketamine/xylazine. The inferior vena cava was clipped, blood was allowed to drain for 1 min, and the liver was excised and quickly placed into ice-cold DPBS without calcium and magnesium (DPBS $^{-/-}$ ). Blocks of  $\sim 0.5$  cm $^3$  from the main lobule were cut with a scalpel and embedded into 4% UltraPure low-melting agarose (Invitrogen) diluted in HBSS without calcium and magnesium. An agarose cube with the tissue inside was sliced into 250- $\mu$ m-thick slices in ice-cold HBSS bath saturated with 95% oxygen/5% CO $_2$  (carbogen) using a Leica VT1000S vibrating-blade microtome (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Selected precision-cut liver slices were individually transferred into P-35 Petri dishes containing the Millicell cell culture inserts (Millipore, Billerica, MA, USA), prebalanced for 20 min with prewarmed William's E medium containing GlutaMAX-I (Invitrogen) supplemented with 25 mM D-glucose and 50  $\mu$ g/ml gentamicin. Liver slices were preincubated at 37°C in a 5% CO $_2$  incubator for 90 min before treatments, and then incubated for 18 h with either vehicle ( $<0.04\%$  ethanol) or the PPAR $\gamma$  agonist rosiglitazone (10  $\mu$ M; Cayman Chemical, Ann Harbor, MI, USA) in the absence or presence of oleic acid (200  $\mu$ M; Sigma) plus 25 mM of D-glucose and 1.5% FFA-free BSA in William's E medium (Sigma) supplemented with 1% FBS, 2 mM L-glutamine, 50 IU/ml penicillin, 50  $\mu$ g/ml streptomycin, 1  $\mu$ M insulin, 15 mM HEPES, and 50  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoethanol. At the end of the incubation period, culture medium was collected to determine ALT activity, and liver slices were placed into 12-well plastic tissue plates and washed with DPBS to assess Oil Red-O staining, as described below.

## Isolation and culture of primary hepatocytes

Hepatocytes were isolated from PPAR $\gamma^{F/F}$  ( $n=3$ ) and PPAR $\gamma^{\Delta hep}$  ( $n=6$ ) mice, as described previously (25). Animals were anesthetized with ketamine/xylazine, and hepatocytes were isolated by a 3-step *in situ* perfusion procedure using 0.03% collagenase IV through the portal vein. Isolated hepatocytes were plated on collagen I-coated plates (Sigma) and cultured in William's E medium supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 50 IU/ml of penicillin, 50  $\mu$ g/ml streptomycin, 1  $\mu$ M insulin, 15 mM HEPES, and 50  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoethanol. Primary hepatocytes were characterized by a combination of phase-contrast microscopy, immunocytochemical analysis (cytokeratin 8-positive), and periodic acid-Schiff reaction, and their viability was determined by trypan blue exclusion. Cells were maintained in a humidified 5% CO $_2$  incubator at 37°C. Hepatocytes were cultured in 12-well plates at a density of  $4 \times 10^5$  cells/well and incubated for 18 h with either vehicle, rosiglitazone (10  $\mu$ M), or the PPAR $\gamma$  antagonist bisphenol A diglycidyl ether (BADGE; 10  $\mu$ M; Cayman Chemical) in the absence or presence of oleic acid (200  $\mu$ M) plus 25 mM of D-glucose and 1.5% FFA-free BSA in 1% FBS-supplemented William's E medium. At the end of the incubation period, Oil Red-O staining was assessed as described below. Hepatocytes ( $2 \times 10^5$  cells/well) were also grown in the Permano Lab-Teck Chamber Slide System (Nalge Nunc, Rochester, NY, USA), stained with Oil Red-O, counterstained with Gill's hematoxylin, washed with tap water, mounted with aqueous solution, and visualized under a Nikon Eclipse E600 microscope at  $\times 200$ .

## Oil Red-O staining of precision-cut liver slices and hepatocytes in culture

Precision-cut liver slices and primary hepatocytes were washed twice with DPBS $^{-/-}$ , exposed to 4% paraformaldehyde for

1 h, and then washed with 60% isopropanol before incubation with 0.2% Oil Red-O (Sigma) for 30 min at room temperature. To quantify the amount of Oil Red-O retained by the cells, tissue slices and hepatocytes were incubated with 100% isopropanol for 30 min with shaking to elute the stain. The amount of stain was measured by optical density at 500 nm in a Fluostar Optima microplate reader (BMG Labtech, Offenburg, Germany).

## Analysis of gene expression

Total RNA from liver tissue and hepatocytes was obtained using the Trizol reagent (Invitrogen). RNA concentration was assessed in a UV spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA), and its integrity was tested in a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Samples were retrotranscribed with the high-capacity cDNA archive kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). End-point RT-PCR amplifications were performed with specific oligonucleotides, and DNA amplification was achieved with BioTherm DNA polymerase (Genecraft, Köln, Germany). Briefly, the PCR reaction mixture (adjusted with ddH $_2$ O to 25  $\mu$ l final volume) contained 2  $\mu$ l cDNA, 2.5  $\mu$ l 10 $\times$  reaction buffer, 4  $\mu$ l dNTPs (1.25 mM), 1.25  $\mu$ l MgCl $_2$  (2.5 mM), 0.2  $\mu$ l BioTherm TaqDNA Polymerase (5 U/ $\mu$ l) and 1.5  $\mu$ l of PPAR $\gamma$  (0.6  $\mu$ M) or 2  $\mu$ l of GAPDH (0.8  $\mu$ M) primers. Samples were amplified for 4 min at 96°C, followed by 35 cycles of 96°C for 30 s, 54.6°C for 1 min, and 72°C for 30 s, with a final elongation step at 71.5°C for 3 min. PCR products were analyzed by electrophoresis in 2.5% agarose gels and visualized by ethidium bromide staining using a 100-bp DNA ladder marker (Invitrogen). PPAR $\gamma$  primers were 5'-CATGGTGCCTTCGCTGAT-3' and 5'-CAATGGCCAT-GAGGGAGTTA-3', that amplify a 373-bp DNA fragment. GAPDH primers were 5'-TCCAGTATGACTCCACTC-3' and 5'-ATTCTCGTGGTTCACAC-3', which yield a 279-bp DNA fragment. The specificity of these primers was confirmed in the GenBank database using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) and by direct sequencing of the amplified PCR products in an ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer using a Big Dye Terminator 3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems).

To quantify PPAR $\gamma$  expression in the liver by real-time PCR, we used a ready-to-use primer and probe set (Mm00440940\_m1) in an ABI Prism 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems), with  $\beta$ -actin (Mm00607939\_s1) as an endogenous control. Because of the *loxP*-targeted PPAR $\gamma$  gene construct, these primers do not discern between the knockout and wild-type gene sequences, and for this reason, we designed a new custom set of primers and probes for the PPAR $\gamma$  isoform 1 (PPAR $\gamma$ 1) using Primer Express 3.0 software for real-time PCR (Applied Biosystems). By using this program, we were able to locate a set of primers that expand exons 2 and 4 of the PPAR $\gamma$ 1 transcript [National Center for Biotechnology Information (NCBI) Sequence Reference: NM\_001127330.1], which are not amplified in the knockout gene. We also assessed the expression of PPAR $\gamma$ 2 by using a ready-to-use primers and probe set (Mm00440940\_m1) located between exons 3 and 4 of the PPAR $\gamma$ 2 transcript (NCBI NM\_011146.3). PCR products were analyzed with Sequence Detector 2.1 software (Applied Biosystems). The amount of target gene, normalized to  $\beta$ -actin and relative to a calibrator, was determined by the arithmetic formula  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  described in the comparative  $C_t$  method.

Real-time PCR analysis of acetyl-CoA carboxylase (ACC; Mm01304285\_m1), acetyl-CoA oxidase (ACO; Mm00443579\_m1), fatty acid synthase (FASN; Mm00662319\_m1), fatty acid translocase (FAT/CD36; Mm00432403\_m1), fructose 1,6-bisphosphatase (Fbp1; Mm00490181\_m1), glucose-6-phosphatase, catalytic (G6Pc; Mm00839363-m1), glucose transporter 2 (GLUT-2; Mm00446224\_m1), insulin receptor substrate 2 (IRS-2; Mm03038438\_m1), lipoprotein lipase (LPL; Mm00434764\_m1),

liver-type fatty acid binding protein ( $\alpha$ -FABP; Mm00444340\_m1), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1; Mm00441242\_m1), microsomal triglyceride transfer protein (MTP; Mm00435015\_m1), PPAR $\alpha$  (Mm00440939\_m1), phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK; Mm00440636\_m1), pyruvate carboxylase (Pcx; Mm00490181\_m1), sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c; Mm00550338\_m1), stearoyl-coenzyme A desaturase 1 (SCD1; Mm00772290\_m1), and tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ; Mm00443258\_m1) were also performed in the ABI Prism 7900 Sequence Detection System using  $\beta$ -actin as the endogenous control.

### Analysis of PPAR $\gamma$ protein expression by Western blot

Mouse liver tissue was homogenized in 1 ml of 10 mM HEPES, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 0.3 mM sucrose, 0.1 mM EGTA, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM sodium fluoride, 0.1% Igepal, and protease inhibitors at pH 7.9. The cell lysate was filtered through a nylon gauze, and the nucleus was pelleted by centrifugation at 3000 rpm for 20 min at 4°C. Thereafter, the pellet was washed twice and resuspended in 20 mM HEPES, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 420 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 25% glycerol, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 1 mM sodium orthovanadate, 0.5 mM spermidine, and protease inhibitors at pH 7.9. After frequent vortexing for 15 min, nuclear homogenates were placed in a lab roller for 1 h at 4°C. A total of 40  $\mu$ g of nuclear proteins from liver tissue (determined by the Micro BCA protein assay kit; Pierce, Rockford, IL, USA) was resuspended in SDS-containing Laemmli sample buffer, heated for 5 min at 95°C, and resolved on a 10% SDS-PAGE (from 40% acrylamide/bis; Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Proteins were transferred electrophoretically for 120 min at 400 mA at 4°C onto PVDF membranes, and the efficiency of the transfer was visualized by Ponceau S staining. Membranes were blocked for 1 h at room temperature in TBS (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, and 0.5 M NaCl) containing 0.1% (v/v) Tween 20 (0.1% T-TBS) and 3% (w/v) BSA. 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 PPAR $\gamma$  antibody raised against a recombinant protein corresponding to amino acids 6–105 (H-100; dilution 1:200; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) in 0.1% T-TBS containing 0.6% BSA. After washing 3 times for 5 min each with 0.1% T-TBS, blots were incubated with horseradish-peroxidase-linked donkey anti-rabbit antibody (dilution 1:5000) for 1 h at room temperature in 0.1% T-TBS containing 0.6% BSA. Bands were visualized by enhanced chemiluminescence (ECL) detection system (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK).

### JNK and CREB phosphorylation

Total protein from liver, muscle, and adipose tissues was extracted using a modified RIPA buffer containing 50 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, 1% Igepal, 0.25% sodium deoxycholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM sodium fluoride, 1 mM sodium orthovanadate, and protease inhibitors. Homogenates were incubated on ice for 15 min with frequent vortexing and centrifuged at 16,100 *g* for 20 min at 4°C (previous to the centrifugation, adipose tissue homogenates were placed in a lab roller for 1 h at 4°C and sonicated 3 times at 30-s intervals at 4°C). CREB (48H2) and phospho(Ser133)-CREB and SAPK/JNK (56G8) and phospho(Thr183/Tyr185)-SAPK/JNK protein expression was analyzed by Western blot. Equal quantities of total protein from the supernatants (50, 80, and 100  $\mu$ g for liver, muscle, and adipose tissues, respectively) were placed in SDS-containing Laemmli sample buffer, heated for 5 min at 95°C, and

separated by 12% SDS-PAGE. Proteins were electroblotted for 120 min at 400 mA at 4°C onto PVDF membranes, and the efficiency of the transfer was visualized by Ponceau S staining. Membranes were then soaked for 1 h at room temperature in 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 phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) antibody (dilution 1:250; Cell Signaling, Danvers, MA, USA) in 0.1% T-TBS containing 5% BSA, or primary rabbit anti-mouse phospho-CREB (Ser133) antibody (dilution 1:500). Thereafter, blots were washed 3 times for 5 min each with 0.1% T-TBS containing 5% nonfat dry milk and 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 the EZ-ECL chemiluminescence detection kit (Biological Industries, Haemek, Israel). To assess total JNK and CREB protein expression, membranes were stripped at 50°C for 20 min in 100 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 2% SDS, and 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8) and reblotted overnight at 4°C with primary rabbit anti-mouse SAPK/JNK (56G8) antibody (dilution 1:250) or primary rabbit anti-mouse CREB (48H2) monoclonal antibody (dilution 1:500) (Cell Signaling). Membranes were visualized as described above.

### Measurement of cAMP by EIA

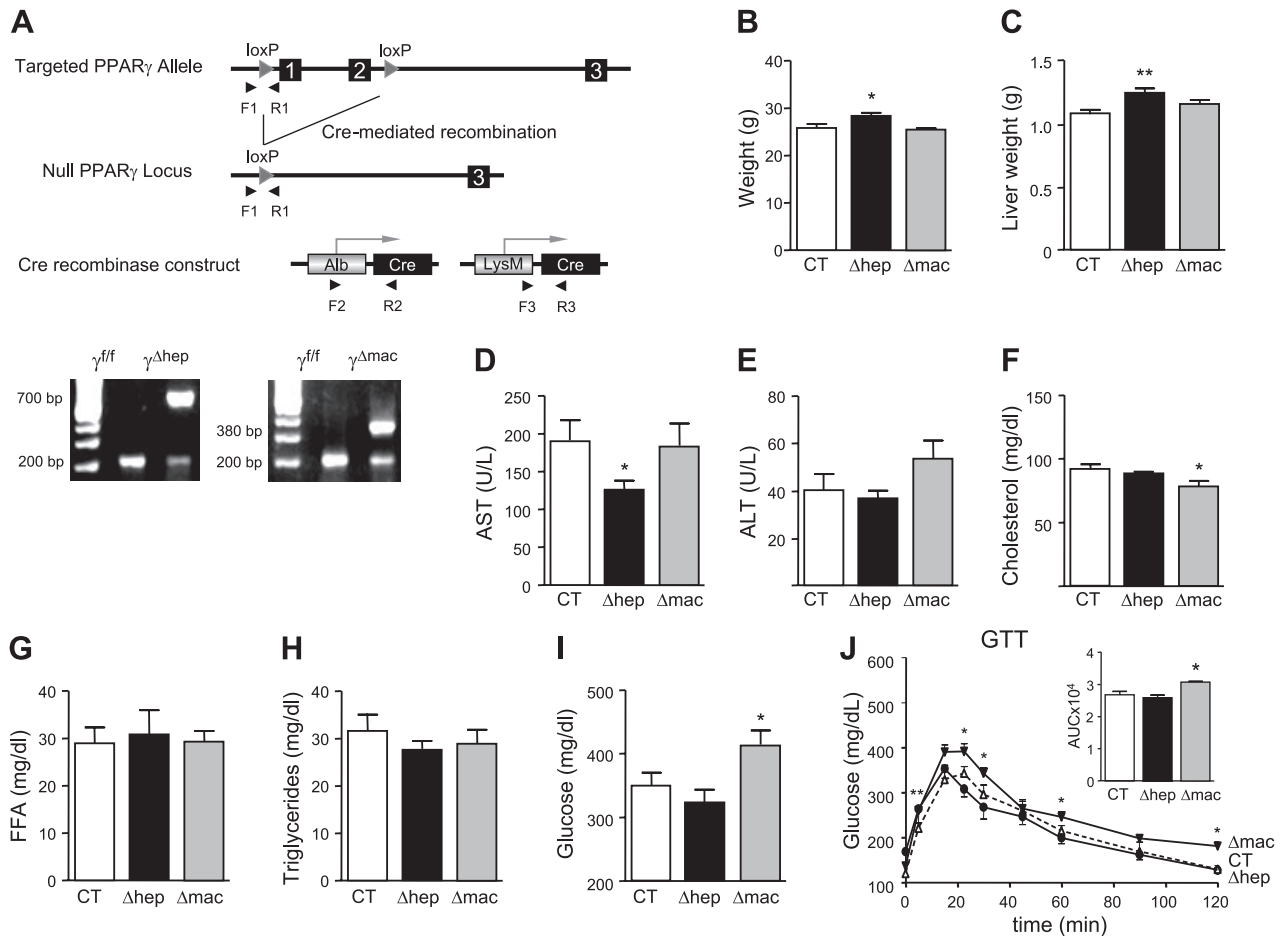
Frozen liver tissue from HFD-fed mice was homogenized in 5 vol of 5% trichloroacetic acid (TCA) in order to purify tissue samples from IgG and phosphodiesterases. Homogenates were centrifuged 10 min at 1500 *g* at 4°C, and TCA was extracted 3 times from supernatants using 5 vol of water-saturated diethyl ether. Extracted samples were heated at 70°C for 5 min to remove residual ether from aqueous layer and stored at 4°C for determination of cAMP levels. The standard curve was prepared with the matrix solution of 5% TCA water-saturated diethyl ether, and standards and samples were acetylated prior to the analysis in a competitive EIA assay (Cayman Chemical).

Statistical analysis of the results was performed by ANOVA (1-way or 2-way) or unpaired Student's *t* test. Results are expressed as means  $\pm$  SE, and differences were considered significant at values of *P* < 0.05.

## RESULTS

Cre-*loxP*-mediated gene targeting was used to specifically delete PPAR $\gamma$  either in hepatocytes or in macrophages. To this purpose, mice harboring *loxP* sites flanking exons 1 and 2 of PPAR $\gamma$  (22) were mated to transgenic mice expressing Cre recombinase under the control of either albumin or LysM promoter (23, 24) to produce specific deletions of PPAR $\gamma$  in hepatocytes (PPAR $\gamma^{\Delta\text{hep}}$ ) or macrophages (PPAR $\gamma^{\Delta\text{mac}}$ ), respectively (Fig. 1A). The specificity of the Cre-*loxP* technology was evaluated by genotyping liver DNA from PPAR $\gamma^{\Delta\text{hep}}$  and PPAR $\gamma^{\Delta\text{mac}}$  mice with mouse-specific multiplex PCR primers made up of either the Alb-Cre (F2 and R2) or LysM-Cre (F3 and R3) transgene sequences, respectively (see Supplemental Table S1). Liver DNA genotyping of PPAR $\gamma^{\Delta\text{hep}}$  and PPAR $\gamma^{\Delta\text{mac}}$  mice showed a 200-bp band corresponding to the floxed PPAR $\gamma$  gene and either 700- or 380-bp bands





**Figure 1.** Genotype and phenotype characteristics of conditional PPAR $\gamma$ -knockout mice specific for hepatocytes ( $\Delta$ hep) and macrophages ( $\Delta$ mac). **A**) Schematic representation of the targeted PPAR $\gamma$  allele, null PPAR $\gamma$  locus, and albumin (Alb) and lysozyme M (LysM) Cre recombinase constructs and PCR analysis of genomic liver DNA isolated from control [CT; *loxP*-targeted PPAR $\gamma$  gene ( $\gamma^{f/f}$ ); 200 bp],  $\gamma\Delta$ hep (700 bp), and  $\gamma\Delta$ mac (380 bp) mice. A 100-bp DNA ladder was used as a size standard (M). **B–I**) Body weight (**B**), liver weight (**C**), serum AST activity (**D**), serum ALT activity (**E**), and serum cholesterol (**F**), FFA (**G**), triglyceride (**H**) and glucose levels (**I**) in CT ( $n=8$ ), PPAR $\gamma^{\Delta$ hep ( $\Delta$ hep;  $n=9$ ), and PPAR $\gamma^{\Delta$ mac ( $\Delta$ mac;  $n=7$ ) mice maintained on a chow diet. **J**) Glucose tolerance assessed by GTT curves and calculated area under the curve (AUC; inset). Results are expressed as means  $\pm$  SE. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. CT.

corresponding to Cre recombinase under the albumin or LysM promoter, respectively, whereas PPAR $\gamma^{f/f}$  littermates only showed the 200-bp band and served as control mice (Fig. 1A, bottom panel). Inactivation of PPAR $\gamma$  in hepatocytes (PPAR $\gamma^{\Delta$ hep) caused a mild phenotype in 20-wk-old male mice, characterized by increased body and liver weight and decreased serum AST levels (Fig. 1B–D). As compared to control mice, liver/body weight ratio remained unaltered in PPAR $\gamma^{\Delta$ hep mice (data not shown). In these mice, no changes in serum ALT, cholesterol, FFA, triglyceride, and glucose levels or glucose tolerance were observed (Fig. 1E–J). In contrast, inactivation of PPAR $\gamma$  in macrophages (PPAR $\gamma^{\Delta$ mac) reduced serum cholesterol levels but increased serum glucose concentrations and induced a moderate impairment in glucose tolerance (Fig. 1F, I, J). PPAR $\gamma^{\Delta$ mac mice also showed elevated serum ALT levels, although changes did not reach statistical significance (Fig. 1E). No changes in body and liver weight and serum levels of AST, FFA, and triglycerides were observed in these mice (Fig. 1B–D, G, H).

To assess the direct effects of hepatocyte and macrophage-specific PPAR $\gamma$  ablation on liver gene expression, we measured mRNA expression of target genes under the transcriptional control of PPAR $\gamma$ . As shown in **Table 1**, ablation of hepatocyte PPAR $\gamma$  resulted in significant down-regulation of the lipogenic gene LPL without changes in genes coding for proteins involved in fatty acid transport (CD36/FAT, L-FABP, and MTP), lipogenesis (SREBP-1c, SCD1, ACC, and FASN), fatty acid oxidation (PPAR $\alpha$  and ACO), glucose metabolism, and insulin signaling (GLUT-2, IRS-2, PEPCK, Pcx, Fbp1, and G6Pc) and inflammation (MCP-1 and TNF- $\alpha$ ). On the other hand, ablation of PPAR $\gamma$  in macrophages significantly up-regulated mRNA expression of the lipogenic genes ACC and FASN, as well as that of the gluconeogenic genes Fbp1 and G6Pc (Table 1).

Since mice fed a chow diet did not show a major phenotype, we subjected control, PPAR $\gamma^{\Delta$ hep, and PPAR $\gamma^{\Delta$ mac mice to the HFD-induced experimental model of dietary obesity. After 12 wk of HFD treatment, mice developed increased adiposity characterized by

TABLE 1. Quantitative analysis of hepatic gene expression in control, PPAR $\gamma^{\Delta hep}$ , and PPAR $\gamma^{\Delta mac}$  mice fed rodent chow diet

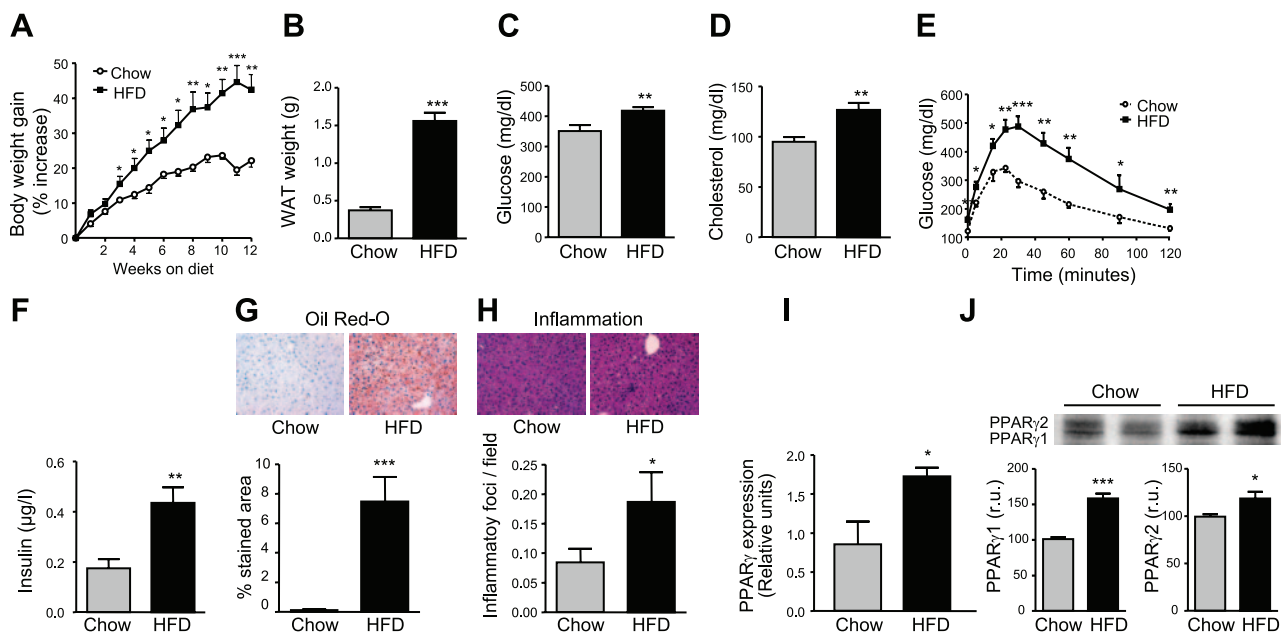
Gene name	Control, n = 8	PPAR $\gamma^{\Delta hep}$ , n = 9	PPAR $\gamma^{\Delta mac}$ , n = 7
CD36/FAT	1.056 $\pm$ 0.06	1.170 $\pm$ 0.11	1.449 $\pm$ 0.25
L-FABP	0.906 $\pm$ 0.08	0.898 $\pm$ 0.08	0.880 $\pm$ 0.09
MTP	1.026 $\pm$ 0.09	0.984 $\pm$ 0.04	1.268 $\pm$ 0.23
LPL	0.860 $\pm$ 0.05	0.678 $\pm$ 0.05*	0.932 $\pm$ 0.07
SREBP-1c	1.030 $\pm$ 0.06	1.156 $\pm$ 0.05	1.146 $\pm$ 0.18
SCD1	0.752 $\pm$ 0.12	0.632 $\pm$ 0.07	0.819 $\pm$ 0.08
ACC	0.963 $\pm$ 0.06	0.958 $\pm$ 0.04	1.359 $\pm$ 0.14*
FASN	0.893 $\pm$ 0.15	0.768 $\pm$ 0.08	1.359 $\pm$ 0.17*
PPAR $\alpha$	1.082 $\pm$ 0.11	0.907 $\pm$ 0.09	0.845 $\pm$ 0.07
ACO	0.946 $\pm$ 0.14	0.837 $\pm$ 0.03	0.842 $\pm$ 0.06
GLUT-2	0.596 $\pm$ 0.10	0.581 $\pm$ 0.08	0.570 $\pm$ 0.07
IRS-2	1.415 $\pm$ 0.29	1.061 $\pm$ 0.09	1.313 $\pm$ 0.24
PEPCK	0.941 $\pm$ 0.12	0.722 $\pm$ 0.08	0.805 $\pm$ 0.11
Pcx	0.637 $\pm$ 0.17	0.625 $\pm$ 0.13	0.664 $\pm$ 0.18
Fbp1	0.887 $\pm$ 0.15	0.944 $\pm$ 0.20	1.050 $\pm$ 0.13*
G6Pc	0.616 $\pm$ 0.40	0.467 $\pm$ 0.34	1.016 $\pm$ 0.32*
TNF- $\alpha$	2.100 $\pm$ 0.37	2.723 $\pm$ 0.18	2.220 $\pm$ 0.31
MCP-1	2.553 $\pm$ 0.46	2.453 $\pm$ 0.45	2.545 $\pm$ 0.42

Data are expressed as means  $\pm$  SE. \* $P$  < 0.05 vs. control.

statistically significant differences in terms of body weight gain, white adipose tissue weight, and serum glucose and cholesterol levels compared to a group fed a chow diet (Fig. 2A–D). In this dietary model of obesity, mice also developed impaired glucose tolerance and hyperinsulinemia (Fig. 2E, F) accompanied by an increased area stained with Oil Red-O and an

increased number of inflammatory foci, indicative of advanced hepatic steatosis and inflammation, respectively (Fig. 2G, H). This hepatic phenotype was paralleled by an overexpression of PPAR $\gamma$  in this tissue at both the mRNA and protein levels (Fig. 2I, J).

The analysis of the 3 mouse strains subjected to the HFD model revealed that loss of PPAR $\gamma$  in hepatocytes



**Figure 2.** Increased hepatic expression of PPAR $\gamma$  in mice with HFD-induced obesity. A–F) Body weight gain (A), white adipose tissue (WAT) weight (B), serum glucose level (C), serum cholesterol level (D), GTT (E), and serum insulin level (F) in mice fed either a chow diet ( $n=8$ ) or an HFD (60% kcal from fat;  $n=13$ ) for 12 wk. G, H) Effects on hepatic steatosis (G) and inflammation (H). Representative photomicrographs and histomorphometric analysis of liver sections stained with Oil Red-O and H&E (original view  $\times 200$ ). I) mRNA expression of PPAR $\gamma$  in liver tissue samples was determined by real-time PCR. J) Top panel: protein expression of PPAR $\gamma$  was analyzed by Western blot. Bottom panels: densitometric analysis of both PPAR $\gamma$  isoform 1 (53 kDa) and PPAR $\gamma$  isoform 2 (57 kDa) bands. Results are expressed as means  $\pm$  SE. \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, \*\*\* $P$  < 0.001 vs. mice fed a chow diet.

did not affect body weight, liver weight, liver/body weight ratio, adipose tissue weight, adipose tissue/body weight ratio and serum cholesterol, FFA, triglyceride, AST, and ALT levels (**Table 2**). Similarly, loss of PPAR $\gamma$  in macrophages had no significant effect on body weight, liver weight, liver/body weight ratio, adipose tissue weight, adipose tissue/body weight ratio, and serum cholesterol and AST levels but significantly increased serum FFA, triglyceride, and ALT levels (Table 2). Notably, deletion of PPAR $\gamma$  in these cell types had a major effect on HFD-induced hepatic steatosis. In fact, as compared to controls, the area stained with Oil Red-O in response to the HFD was significantly reduced in PPAR $\gamma^{\Delta\text{hep}}$  and PPAR $\gamma^{\Delta\text{mac}}$  mice (**Fig. 3A**). The extent of changes, however, was much smaller in PPAR $\gamma^{\Delta\text{mac}}$  mice than in PPAR $\gamma^{\Delta\text{hep}}$  mice (**Fig. 3A**). The presence of a greater antisteatotic effect in PPAR $\gamma^{\Delta\text{hep}}$  than in PPAR $\gamma^{\Delta\text{mac}}$  mice after HFD treatment was consistent with results obtained by end-point PCR analysis showing that signal for PPAR $\gamma$  mRNA expression was completely absent in the liver when PPAR $\gamma$  was deleted in hepatocytes, whereas its signal was barely altered when PPAR $\gamma$  was specifically deleted in macrophages (**Fig. 3B**). The evidence that PPAR $\gamma$  expression in the liver is mostly predominant in hepatocytes was confirmed by real-time PCR analysis of both PPAR $\gamma$ 1 and PPAR $\gamma$ 2 transcripts, which were practically absent in livers from PPAR $\gamma^{\Delta\text{hep}}$  mice (**Fig. 3C**). No significant changes in hepatic inflammation were observed in either strain of mice, although PPAR $\gamma^{\Delta\text{hep}}$  mice showed a milder response to the inflammatory injury induced by HFD treatment (**Fig. 3D**). These findings were confirmed by measuring the inflammatory markers TNF- $\alpha$  and MCP-1 in the 3 groups of mice after HFD treatment (**Fig. 3E**).

To confirm the hepatic prosteatotic role of PPAR $\gamma$ , we performed further experiments in precision-cut liver slices obtained from mice fed a chow diet. To induce hepatic steatosis, we incubated tissue slices in 1% FBS William's E medium containing oleic acid (200  $\mu$ M) and high glucose (25 mM) in 1.5% FFA-free BSA. As shown in **Fig. 4A**, tissue slices exposed to oleic acid for 18 h showed a substantial increase in Oil Red-O

staining as well as in ALT activity. An increase in Oil Red-O staining was also noticed when tissue slices were exposed to the PPAR $\gamma$  agonist rosiglitazone for 18 h in the absence or presence of oleic acid (**Fig. 4B**). Interestingly, ALT activity was significantly increased by rosiglitazone and oleic acid in combination, but not by exposure to rosiglitazone alone (**Fig. 4B**). The steatogenic and injury responses to both oleic acid and rosiglitazone were lost in precision-cut liver slices obtained from PPAR $\gamma^{\Delta\text{hep}}$  mice (**Fig. 4C**). In contrast, the responses to these compounds remained intact in precision-cut liver slices from PPAR $\gamma^{\Delta\text{mac}}$  mice (**Fig. 4D**).

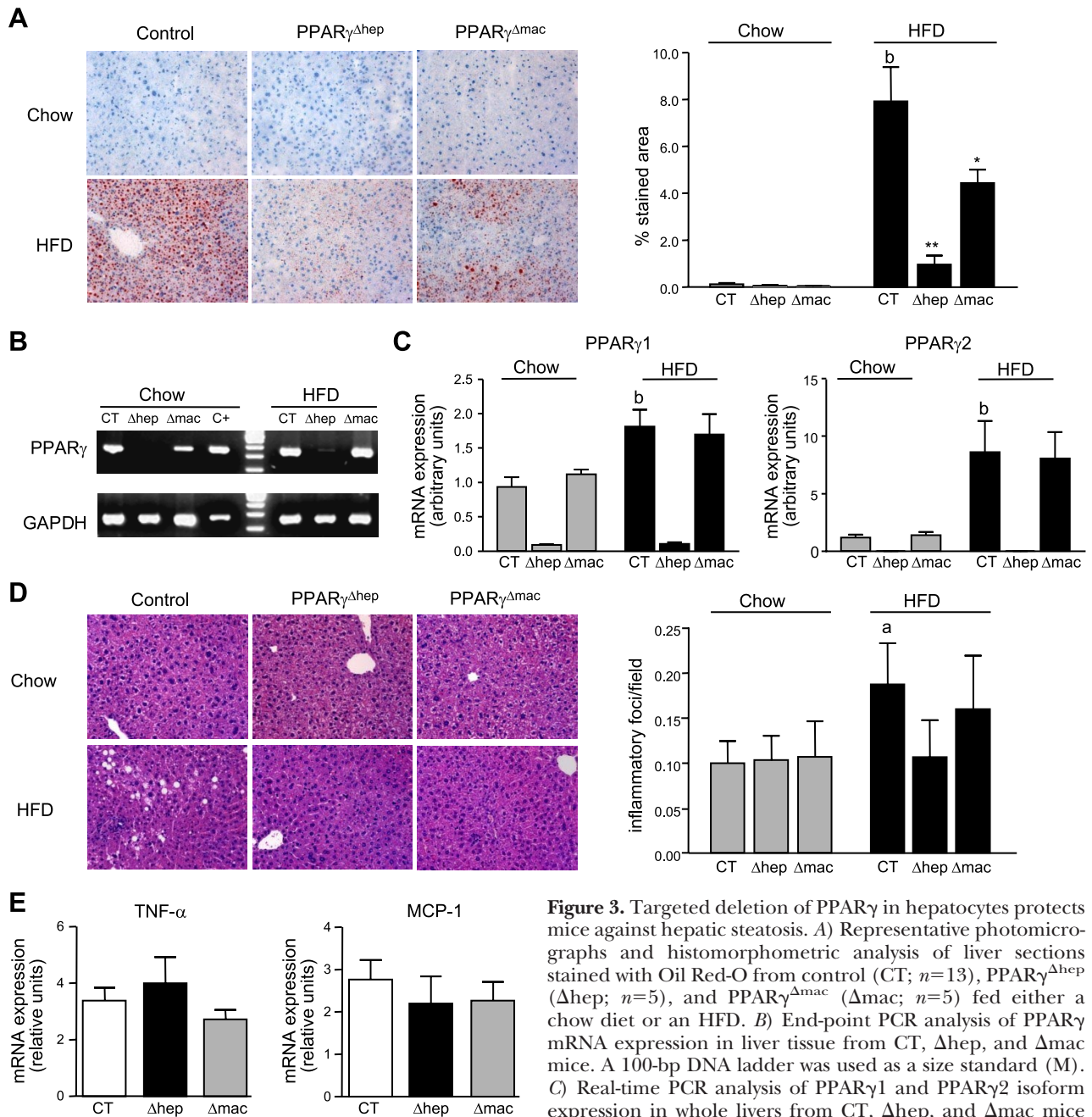
To further confirm the prosteatotic role of PPAR $\gamma$  in parenchymal liver cells, we performed experiments in primary hepatocytes in culture isolated from mice on a chow diet. As shown in **Fig. 5A**, rosiglitazone induced the accumulation of neutral lipids, as detected by Oil Red-O staining, in the cytoplasm of primary hepatocytes isolated from control mice, an effect that was markedly amplified by combination of rosiglitazone with oleic acid. Incubation of hepatocytes with the selective PPAR $\gamma$  antagonist BADGE significantly reduced Oil Red-O staining either in baseline conditions or following oleic acid treatment (**Fig. 5B**). Furthermore, as compared to hepatocytes from control mice, hepatocytes isolated from PPAR $\gamma^{\Delta\text{hep}}$  mice lacking PPAR $\gamma$  expression showed a blunted response to the steatogenic effects induced by oleic acid (**Fig. 5C**). In addition, hepatocytes isolated from PPAR $\gamma^{\Delta\text{hep}}$  mice showed a blunted response to rosiglitazone when incubated either alone or in the presence of oleic acid (**Fig. 5D**).

To understand the molecular mechanisms underlying the prosteatotic role of PPAR $\gamma$  in the liver, we assessed changes in the expression of genes governing hepatic lipogenesis, fatty acid uptake, and fatty acid oxidation in samples of hepatic tissue from the 3 strains of mice fed the HFD. As shown in **Fig. 6A**, significant changes in hepatic lipid metabolism were detected in PPAR $\gamma^{\Delta\text{hep}}$  mice, including down-regulation of the lipogenic genes SREBP-1c, SCD1, and ACC. FASN and LPL expression remained unchanged (**Fig. 6A**). In addition, the expression of FAT/CD36, L-FABP and MTP (genes involved in hepatic lipid uptake and transport), PPAR $\alpha$  (a transcription factor that func-

TABLE 2. Body and liver weight and serum biochemistry values in control, PPAR $\gamma^{\Delta\text{hep}}$ , and PPAR $\gamma^{\Delta\text{mac}}$  mice fed an HFD

Parameter	Control, n = 13	PPAR $\gamma^{\Delta\text{hep}}$ , n = 5	PPAR $\gamma^{\Delta\text{mac}}$ , n = 5
Body weight (g)	31.0 $\pm$ 0.85	31.0 $\pm$ 1.3	31.0 $\pm$ 2.2
Liver weight (g)	1.10 $\pm$ 0.04	1.10 $\pm$ 0.07	1.60 $\pm$ 0.03
Liver/body weight ratio (%)	3.6 $\pm$ 0.14	3.7 $\pm$ 0.19	3.3 $\pm$ 0.14
WAT weight (g)	1.6 $\pm$ 0.12	1.3 $\pm$ 0.25	1.8 $\pm$ 0.30
WAT/body weight ratio (%)	5.0 $\pm$ 0.30	4.2 $\pm$ 0.67	5.4 $\pm$ 0.61
Serum cholesterol (mg/dl)	126.8 $\pm$ 6.26	119.2 $\pm$ 11.27	138.4 $\pm$ 5.15
Serum FFA (mg/dl)	24.08 $\pm$ 2.71	32.88 $\pm$ 6.88	63.18 $\pm$ 14.81**
Serum triglycerides (mg/dl)	51.60 $\pm$ 9.75	53.60 $\pm$ 7.76	77.60 $\pm$ 11.14*
Serum AST (U/L)	184.5 $\pm$ 24.41	188.0 $\pm$ 18.63	192.8 $\pm$ 27.58
Serum ALT (U/L)	32.83 $\pm$ 3.050	35.00 $\pm$ 3.786	53.60 $\pm$ 10.63*

Data are expressed as means  $\pm$  SE. WAT, white adipose tissue. \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.001 vs. control mice.



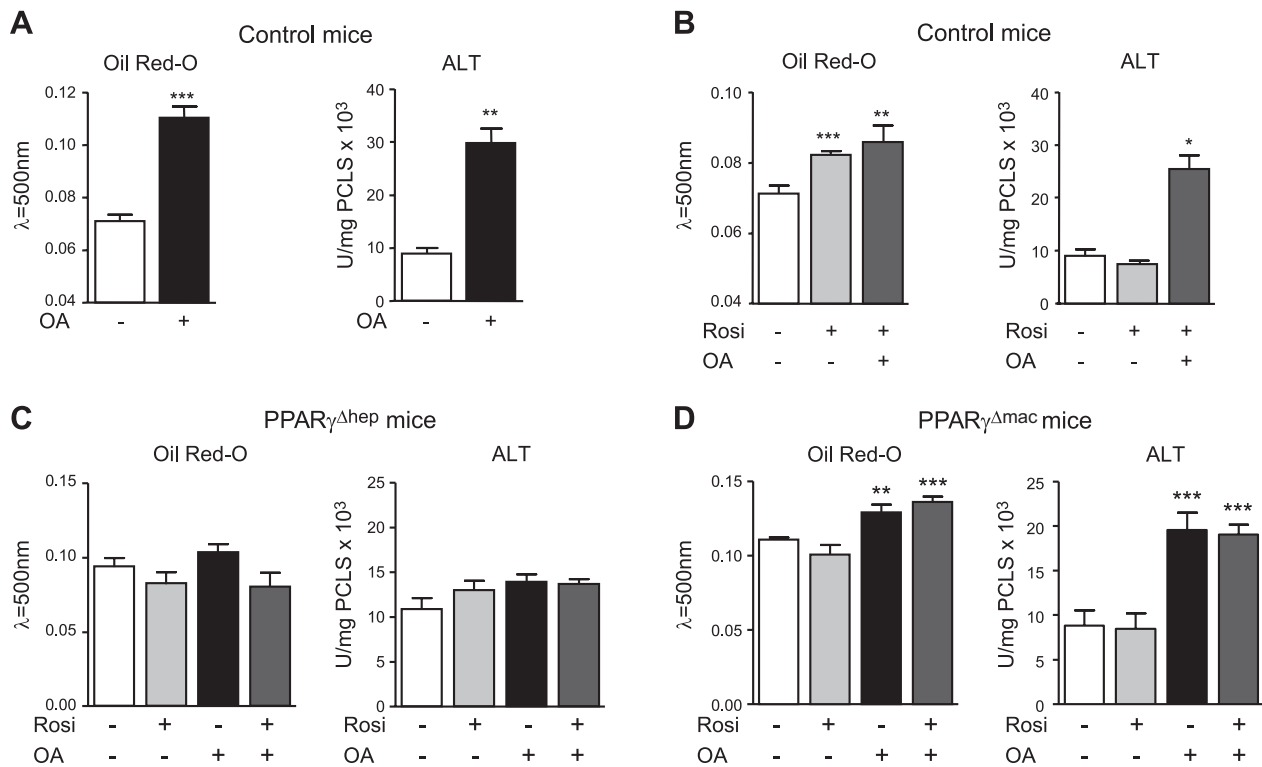
**Figure 3.** Targeted deletion of PPAR $\gamma$  in hepatocytes protects mice against hepatic steatosis. *A*) Representative photomicrographs and histomorphometric analysis of liver sections stained with Oil Red-O from control (CT;  $n=13$ ), PPAR $\gamma^{\Delta hep}$  ( $\Delta hep$ ;  $n=5$ ), and PPAR $\gamma^{\Delta mac}$  ( $\Delta mac$ ;  $n=5$ ) fed either a chow diet or an HFD. *B*) End-point PCR analysis of PPAR $\gamma$  mRNA expression in liver tissue from CT,  $\Delta hep$ , and  $\Delta mac$  mice. A 100-bp DNA ladder was used as a size standard (M). *C*) Real-time PCR analysis of PPAR $\gamma 1$  and PPAR $\gamma 2$  isoform expression in whole livers from CT,  $\Delta hep$ , and  $\Delta mac$  mice fed either a chow or an HFD. *D*) Representative photomicrographs of liver sections stained with H&E from CT,  $\Delta hep$ , and  $\Delta mac$  mice fed either a chow diet or an HFD. Inflammation was scored by a registered pathologist as the number of inflammatory foci per field. *E*) Expression of TNF- $\alpha$  and MCP-1 in liver samples from CT,  $\Delta hep$ , and  $\Delta mac$  mice fed an HFD was assessed by real-time PCR. Results are expressed as means  $\pm$  SE. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. CT mice fed HFD; <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.001$  vs. CT mice fed chow diet.

tions as a gatekeeper of fatty acid oxidation), and ACO (an oxidoreductase involved in fatty acid metabolism) were down-regulated in PPAR $\gamma^{\Delta hep}$  mice (Fig. 6B). These findings were consistent with the notion that PPAR $\gamma^{\Delta hep}$  mice are resistant to HFD-induced hepatic steatosis. Ablation of PPAR $\gamma$  in macrophages, in contrast, did not modify the expression of any of these genes (Fig. 6).

To assess the effects of cell-specific deficiency of PPAR $\gamma$  on glucose homeostasis, HFD-treated mice with targeted deletion of PPAR $\gamma$  in hepatocytes and macrophages were subjected to GTT and ITT. As shown in

**Fig. 7A**, PPAR $\gamma^{\Delta hep}$  mice cleared glucose more efficiently than control mice. Consistent with this finding, serum glucose levels were significantly lower in PPAR $\gamma^{\Delta hep}$  mice than in control mice (Fig. 7B). Interestingly, the improvement in glucose metabolism in PPAR $\gamma^{\Delta hep}$  mice was associated with a significant down-regulation of the hepatic expression of GLUT-2, a glucose transporter likely to act as a sensor of the circulating glucose concentrations (Fig. 7C) and PEPCK, a PPAR $\gamma$  responsive-gene involved in the repression of hepatic gluconeogenesis (Fig. 7F). However, hepatic levels of cAMP and CREB phosphoryla-





**Figure 4.** Assessment of the steatogenic role of PPAR $\gamma$  in precision-cut liver slices. *A*) Precision-cut liver slices from control mice ( $n=4$ ) were incubated for 18 h with either vehicle ( $<0.04\%$  ethanol) or oleic acid (OA; 200  $\mu\text{M}$ ) plus 25 mM of D-glucose and 1.5% FFA-free BSA, and Oil Red-O staining and ALT activity were determined as described in Materials and Methods. *B*) Oil Red-O staining and ALT activity were assessed in precision-cut liver slices incubated for 18 h with either vehicle or rosiglitazone (Rosi, 10  $\mu\text{M}$ ) in the absence or presence of OA (200  $\mu\text{M}$ ). *C*) Oil Red-O staining and ALT activity were assessed in precision-cut liver slices from PPAR $\gamma^{\Delta\text{hep}}$  ( $\Delta\text{hep}$ ) mice ( $n=3$ ) incubated for 18 h with either vehicle or Rosi (10  $\mu\text{M}$ ) in the absence or presence of OA (200  $\mu\text{M}$ ). *D*) Oil Red-O staining and ALT activity were assessed in precision-cut liver slices from PPAR $\gamma^{\Delta\text{mac}}$  ( $\Delta\text{mac}$ ) mice ( $n=3$ ) incubated for 18 h with either vehicle or Rosi (10  $\mu\text{M}$ ) in the absence or presence of OA (200  $\mu\text{M}$ ). Results are expressed as means  $\pm$  SE. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs. vehicle.

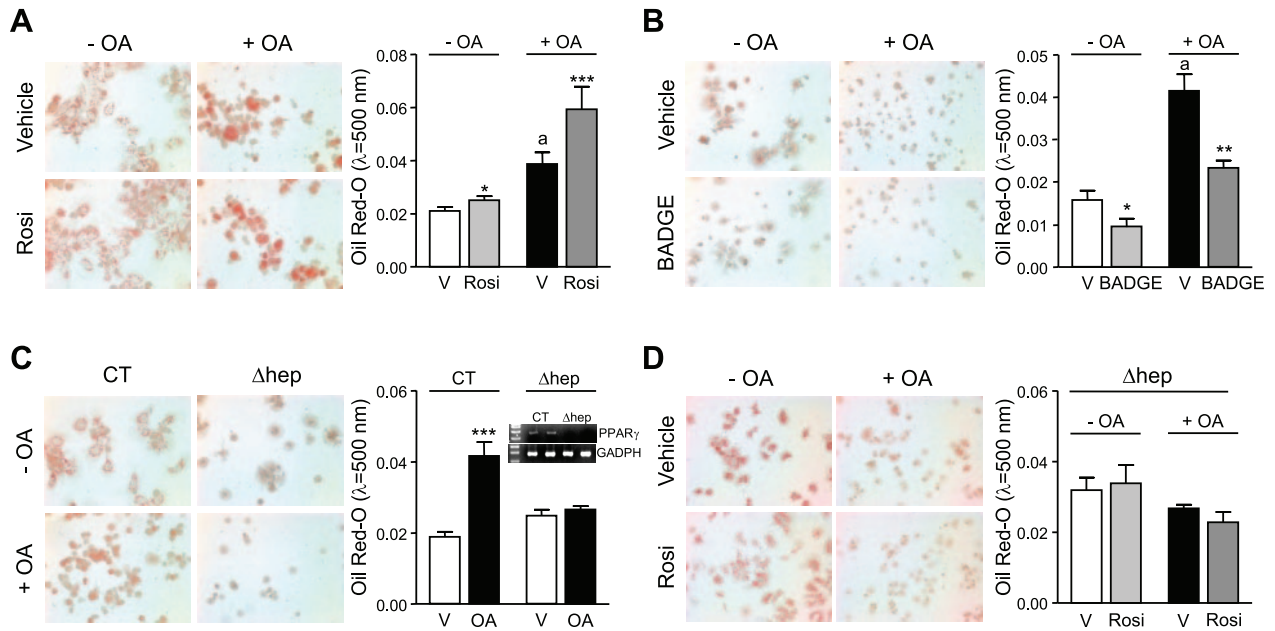
tion and expression of other gluconeogenic genes, such as Pcx, Fbp1, and G6Pc, remained unchanged in PPAR $\gamma^{\Delta\text{hep}}$  mice (Fig. 7D, E, G–I). In addition, the results obtained in the ITT revealed no changes in insulin sensitivity in PPAR $\gamma^{\Delta\text{hep}}$  mice (Fig. 7J). Although JNK phosphorylation was significantly increased by the HFD (data not shown), the levels in liver, muscle, and adipose tissue of this established marker of insulin resistance were similar in control and PPAR $\gamma^{\Delta\text{hep}}$  mice (Fig. 7K). No changes in glucose and insulin tolerance, serum glucose levels, liver cAMP levels, CREB and JNK phosphorylation, and GLUT-2, PEPCK, Pcx, Fbp1, and G6Pc expression were observed in PPAR $\gamma^{\Delta\text{mac}}$  mice (Fig. 7).

## DISCUSSION

NAFLD is the hepatic manifestation of the metabolic syndrome. NAFLD comprises a spectrum of clinical-histological disturbances ranging from simple lipid accumulation in the cytoplasm of hepatocytes (steatosis) to steatosis combined with inflammation and cell injury (steatohepatitis) (5, 26, 27). NAFLD has become an important public health issue because of its high

prevalence and potential progression to more severe forms of liver disease, culminating in liver fibrosis and cirrhosis (26, 27). Although the understanding of the mechanisms underlying the accumulation of fat in hepatocytes and its progression to steatohepatitis is not fully elucidated, PPAR $\gamma$  has been postulated as a contributory factor. In this respect, conclusive evidence has been presented that PPAR $\gamma$  up-regulation is a general property of steatotic livers (6–10).

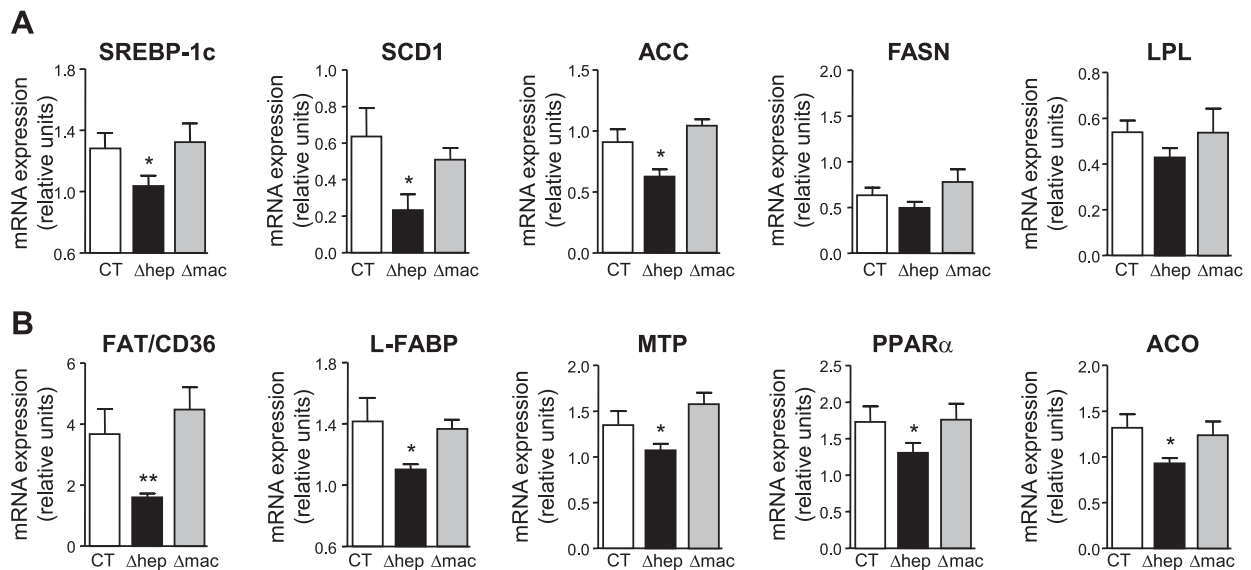
In this study, we used a murine model of diet-induced NAFLD, in which hepatic PPAR $\gamma$  mRNA and protein expression are consistently up-regulated. The major novelty of our investigation was that the comparative role of PPAR $\gamma$  was investigated in more than one cell type relevant to NAFLD pathophysiology. In fact, in our study, in addition to inactivating PPAR $\gamma$  specifically in hepatocytes, the parenchymal cell type predominantly abundant in the liver and the main effector cell in hepatic steatosis, we also evaluated the outcome of PPAR $\gamma$  inactivation in macrophages, which in the liver are represented by Kupffer cells. To inactivate PPAR $\gamma$  specifically in these cell types, we used the Cre-LoxP system under the control of either albumin or LysM promoters to create two different cell-specific PPAR $\gamma$  knockout strains that lack PPAR $\gamma$  in either hepatocytes



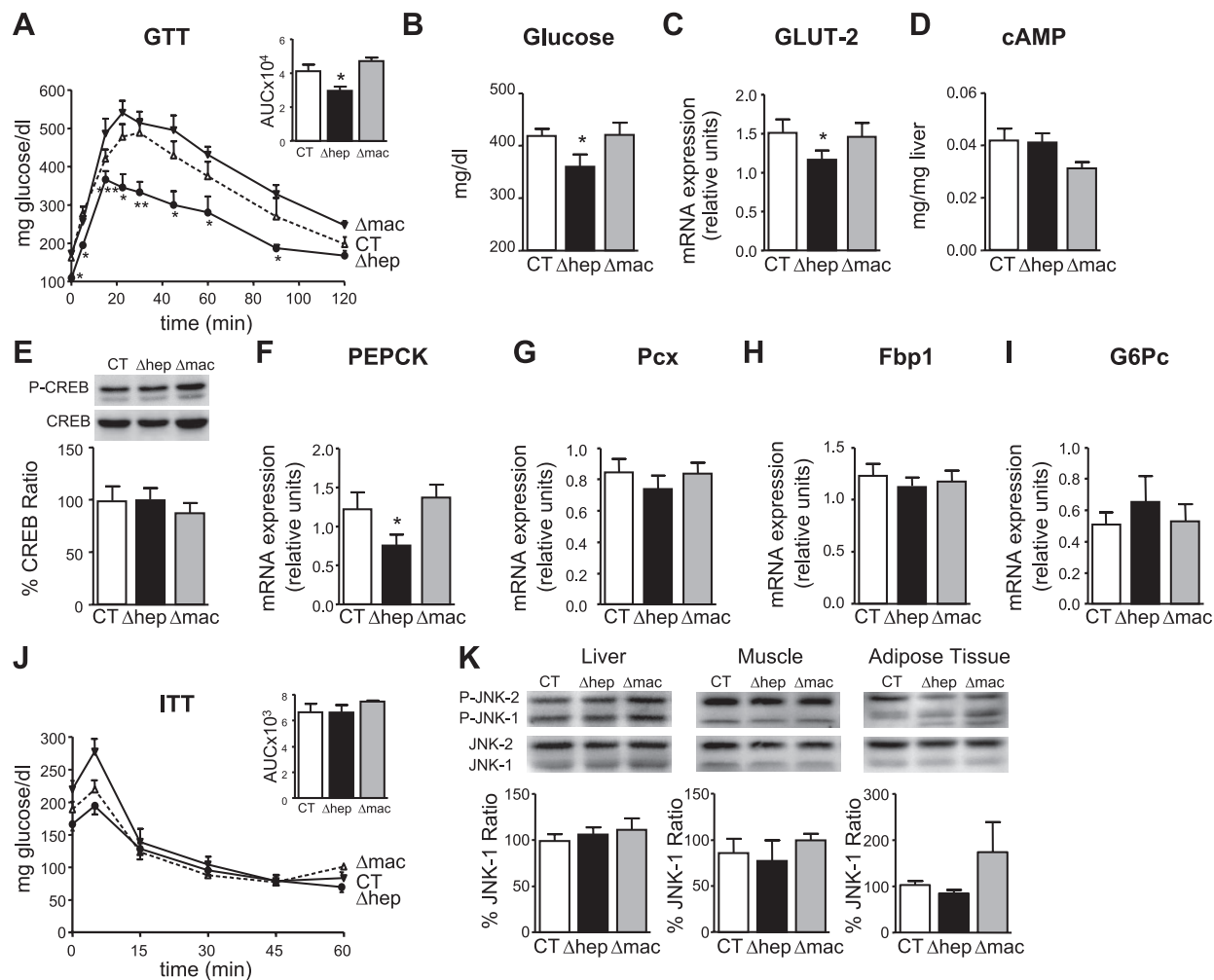
**Figure 5.** Assessment of the steatogenic role of PPAR $\gamma$  in hepatocytes in culture. *A*) Left panels: representative photomicrographs of Oil Red-O stained hepatocytes isolated from control mice ( $n=3$ ) incubated with vehicle ( $<0.04\%$  ethanol) or rosiglitazone (Rosi,  $10\ \mu\text{M}$ ) in the absence or presence of oleic acid (OA,  $200\ \mu\text{M}$ ) for 18 h. Right panel: quantification of Oil Red-O retained by cells. V, vehicle. *B*) Representative photomicrographs (left panels) and quantification (right panel) of Oil Red-O stained hepatocytes incubated with vehicle ( $<0.10\%$  DMSO) or BADGE ( $10\ \mu\text{M}$ ) in the absence or presence of OA ( $200\ \mu\text{M}$ ) for 18 h. *C*) Representative photomicrographs (left panels) and quantification (right panel) of Oil Red-O stained hepatocytes isolated from control (CT,  $n=3$ ) and PPAR $\gamma^{\Delta\text{hep}}$  ( $\Delta\text{hep}$ ,  $n=3$ ) mice. Inset: PCR analysis of PPAR $\gamma$  expression in isolated hepatocytes. *D*) Representative photomicrographs (left panels) and quantification (right panel) of Oil Red-O-stained hepatocytes isolated from PPAR $\gamma^{\Delta\text{hep}}$  ( $\Delta\text{hep}$ ,  $n=3$ ) mice incubated with vehicle or Rosi ( $10\ \mu\text{M}$ ) in the absence or presence of OA ( $200\ \mu\text{M}$ ). Results are expressed as mean  $\pm$  SE. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs. V; <sup>a</sup> $P < 0.0001$  vs. V without OA.

or macrophages. The results of our study demonstrate that PPAR $\gamma$  expression in the liver mostly predominates in hepatocytes and that hepatic steatosis is significantly reduced in hepatocyte-specific PPAR $\gamma$ -null mice. Strong ev-

idence for the steatogenic role of PPAR $\gamma$  in hepatocytes was also provided by experiments in precision-cut liver slices and cultures of primary hepatocytes. In both cases, the PPAR $\gamma$  agonist rosiglitazone increased lipid



**Figure 6.** Targeted deletion of PPAR $\gamma$  in hepatocytes down-regulates the expression of genes involved in hepatic lipid metabolism. *A*) Hepatic expression of the lipogenic genes SREBP-1c, SCD1, ACC, FASN, and the lipid hydrolase LPL in control (CT;  $n=13$ ), PPAR $\gamma^{\Delta\text{hep}}$  ( $\Delta\text{hep}$ ;  $n=5$ ), and PPAR $\gamma^{\Delta\text{mac}}$  ( $\Delta\text{mac}$ ;  $n=5$ ) mice fed an HFD was determined by real time-PCR. *B*) Expression of genes involved in lipid transport (FAT/CD36, L-FABP, and MTP) and oxidation (PPAR $\alpha$  and ACO) in liver samples from CT,  $\Delta\text{hep}$ , and  $\Delta\text{mac}$  mice. Results are expressed as means  $\pm$  SE. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. CT mice.



**Figure 7.** Mice with targeted deletion of PPAR $\gamma$  in hepatocytes clear glucose more efficiently than control mice. *A*) GTT curves in control (CT;  $n=13$ ), PPAR $\gamma^{\Delta hep}$  ( $\Delta hep$ ;  $n=5$ ) and PPAR $\gamma^{\Delta mac}$  ( $\Delta mac$ ;  $n=5$ ) mice fed an HFD. Inset: calculated area under the curve (AUC). *B*) Serum glucose levels in the 3 groups of mice. *C*) Hepatic expression of GLUT-2 was assessed by real-time PCR. *D*) cAMP levels were determined by specific EIA in liver samples from CT ( $n=13$ ),  $\Delta hep$  ( $n=5$ ), and  $\Delta mac$  ( $n=5$ ) mice. *E*) Top panels: CREB phosphorylation was determined by Western blot in liver samples from CT,  $\Delta hep$ , and  $\Delta mac$  mice. Bottom panel: densitometric analysis of phosphorylated CREB bands. *F–I*) Hepatic mRNA expression of the gluconeogenic genes PEPCK (*F*), Pcx (*G*), Fbp1 (*H*), and G6Pc (*I*) was assessed by real-time PCR. *J*) Insulin sensitivity was assessed by ITT curves in CT,  $\Delta hep$ , and  $\Delta mac$  mice fed an HFD. Inset: calculated AUC. *K*) Top panels: JNK phosphorylation (p-JNK-1 and p-JNK-2) was determined in liver, muscle, and adipose tissues by Western blot. p-JNK-1, p-JNK2, and total JNK were detected by phospho-SAPK/JNK (Thr183 and Tyr185) and by specific anti-total JNK antibodies, respectively. Bottom panels: densitometric analysis of phosphorylated JNK-1 bands. Results are expressed as means  $\pm$  SE. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs. CT mice.

stores, an effect that was abrogated in hepatocytes exposed to a PPAR $\gamma$  antagonist and in hepatocytes lacking PPAR $\gamma$  expression. It is important to note that rosiglitazone not only activates PPAR $\gamma$  but also induces its expression (28). These findings are consistent with previous studies showing that the genesis of NAFLD is markedly attenuated in liver-specific PPAR $\gamma$ -knockout mice (12, 13). Also, consistent with previous studies (11, 12, 14, 15), our results indicate that protection from HFD-induced hepatic steatosis in hepatocyte-specific PPAR $\gamma$ -null mice is mediated by mechanisms involving down-regulation of genes coding for lipogenic and fatty acid transport proteins, accompanied by an improvement in glucose tolerance.

Kupffer cells, the liver-resident macrophages, are closely involved in the liver's response to infection,

toxins, and transient ischemia and play a major role in hepatic inflammation (29). Recent studies have pointed toward the possibility that Kupffer cells are also involved in hepatic steatosis (19). Depletion of Kupffer cells has been shown to either prevent (19–21) or exacerbate (30) HFD-induced hepatic insulin resistance and steatosis. In our study, hepatic lipid accumulation in response to an HFD was reduced to some extent in macrophage-specific PPAR $\gamma$ -null mice, thus suggesting that in addition to hepatocytes, expression of PPAR $\gamma$  in macrophages also plays a role in HFD-induced hepatic steatosis. More important, in lean mice, deletion of PPAR $\gamma$  in macrophages led to increased serum glucose levels accompanied by glucose intolerance and up-regulation of gluconeogenic genes, confirming the notion that expression of PPAR $\gamma$  in

macrophages is required for normal glucose homeostasis (31). On the other hand, because of their proximity, nonparenchymal liver cell signals are likely to influence glucose and lipid metabolism in hepatocytes. In this regard, crosstalk between Kupffer cells and hepatocytes in the regulation of hepatic fat and glucose homeostasis has been suggested. In fact, Kupffer cell-derived TNF- $\alpha$  has been shown to induce alterations in hepatocyte fatty acid oxidation, triglyceride accumulation, and insulin responsiveness (19), whereas Kupffer cell-derived IL-1 $\alpha$  has been proposed to contribute to hepatic steatosis by suppressing PPAR $\alpha$  activity in hepatocytes (20). Exploring the existence of a crosstalk among liver cell types is very cumbersome. However, our findings in precision-cut liver slices, which is a reliable method to study liver pathophysiology because in this model lobular hepatic architecture is maintained and cell-cell interactions mimic the *in vivo* situation (32), indicate that activation of PPAR $\gamma$  in hepatocytes is sufficient to initiate hepatic steatosis. In contrast, activation of PPAR $\gamma$  in Kupffer cells appeared not to be critical for the initiation of hepatic steatosis.

An apparent paradox of the role of PPAR $\gamma$  in NAFLD lies in the observation that PPAR $\gamma$  is a steatogenic factor in the liver, whereas its activation is a putative target for the treatment of NAFLD. In this regard, both short- and long-term administration of TZDs have been shown to improve hepatic steatosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis (16, 17). However, it can be argued that rosiglitazone treatment produces an improvement of hepatic steatosis as a consequence of its primary insulin-sensitizing effects on adipose tissue (17). In fact, TZDs act directly on adipose tissue, with secondary effects in liver and skeletal muscle (12, 33–35). Evidence in support of this contention includes the observation that TZD treatment improves body-glucose homeostasis and triglyceride levels in liver-specific and muscle-specific PPAR $\gamma$ -knockout mice, suggesting that PPAR $\gamma$  expression in these tissues contributes relatively little to the beneficial effects of insulin-sensitizing drugs (12, 34, 35). Although a number of studies argue for prolonged therapy with TZDs in NAFLD, presumably there are side-effects and safety issues with these drugs that need to be carefully assessed. For instance, prolonged treatment of obese diabetic KKA<sup>y</sup> mice with TZDs or administration of rosiglitazone to *ob/ob* mice results in severe hepatic steatosis, suggesting that administration of these drugs in a scenario where PPAR $\gamma$  is highly expressed in the liver may induce a steatogenic response (7, 13).

In contrast to steatosis, there were no consistent and beneficial effects on hepatic inflammation of specific deletion of PPAR $\gamma$  in hepatocytes. Most surprising was the observation that the degree of hepatic inflammation was not aggravated by the specific deletion of PPAR $\gamma$  in macrophages. Although PPAR $\gamma^{\Delta\text{Mac}}$  mice displayed a significant increase in serum ALT levels after HFD treatment, the number of inflammatory foci and the expression of established inflammatory markers, such as TNF- $\alpha$  and MCP-1, were not significantly different in macro-

phage-specific PPAR $\gamma$ -null mice and their control littermates. These findings contrast with previous publications showing that expression of PPAR $\gamma$  in nonparenchymal liver cells (namely hepatic stellate cells and Kupffer cells) conveys anti-inflammatory and antifibrogenic properties to the liver (36–38). In this respect, PPAR $\gamma$  ligands have been shown to oppose inflammatory pathways in Kupffer cells (39). Furthermore, ectopic expression of PPAR $\gamma$  or activation of PPAR $\gamma$  with TZDs are able to reverse activated hepatic stellate cells to the quiescent state (36, 40, 41). Collectively, our results suggest the need to test mice bearing a targeted disruption of the PPAR $\gamma$  gene in macrophages in other models of liver injury and inflammation in order to avoid confounding factors related to the HFD model and, therefore, unmask the putative anti-inflammatory role of PPAR $\gamma$  in nonparenchymal liver cells.

In summary, by means of cell type-specific gene-knockout technology, the current study provides conclusive data that PPAR $\gamma$  expression in the liver, especially in hepatocytes, can function as a steatogenic-inducer gene. The most important implication of this observation, taken with other studies in this area, is that further studies are needed to elucidate more clearly whether TZD therapy is both effective and sustainable in patients with NAFLD, as well as to define its full spectra of effects in individuals with high-level expression of PPAR $\gamma$  in the liver. EJ

Supported by a grant from the Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN; SAF 09/08767). CIBERehd is funded by the Instituto de Salud Carlos III. The authors' laboratory is a consolidated research group recognized by the Generalitat de Catalunya (2009SGR1484). This work was carried out, in part, at the Esther Koplowitz Center (Barcelona, Spain). E.M.-S. (contract AP2007-02004) was supported by MICINN. E.T. and A.G.-P. had contracts with CIBERehd. C.L.-V. and V.G.-A. were supported by IDIBAPS and MICINN, respectively.

## REFERENCES

- Barak, Y., Kim, S. (2007) Genetic manipulations of PPARs: effects on obesity and metabolic disease. *PPAR Res.* **2007**, 1–12
- Kersten, S., Desvergne, B., and Wahli, W. (2000) Roles of PPARs in health and disease. *Nature* **405**, 421–442
- Olefsky, J. M. (2000) Treatment of insulin resistance with peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J. Clin. Invest.* **106**, 467–472
- Chawla, A., Repa, J. J., Evans, R. M., and Mangelsdorf, D. J. (2001) Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science* **294**, 1866–1870
- Brunt, E. M., Tiniakos, D. G. (2010) Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* **16**, 5286–5296
- Memon, R. A., Tecott, L. H., Nonogaki, K., Beigneux, A., Moser, A. H., Grunfeld, C., and Feingold, K. R. (2000) Up-regulation of PPAR-alpha and PPAR-gamma messenger ribonucleic acid expression in the liver in murine obesity: troglitazone induces expression of PPAR-gamma-responsive adipose tissue-specific genes in the liver of obese diabetic mice. *Endocrinology* **141**, 4021–4031
- Bedoucha, M., Atzpodien, E., and Boelsterli, U. A. (2001) Diabetic KKA<sup>y</sup> mice exhibit increased hepatic PPARgamma gene expression and develop hepatic steatosis upon chronic treatment with antidiabetic thiazolidinediones. *J. Hepatol.* **35**, 17–23
- Vidal-Puig, A., Jimenez-Liñan, M., Lowell, B. B., Hamann, A., Hu, E., Spiegelman, B., Flier, J. S., and Moller, D. E. (1996)



- Regulation of PPARgamma gene expression by nutrition and obesity in rodents. *J. Clin. Invest.* **97**, 2553–2561
9. Edvardsson, U., Bergström, M., Alexandersson, M., Bamberg, K., Ljung, B., and Dahlöf, B. (1999) Rosiglitazone (BRL49653), a PPARgamma-selective agonist, causes peroxisome proliferator-like liver effects in obese mice. *J. Lipid Res.* **40**, 1177–1184
  10. Rahimian, R., Masih-Khan, E., Lo, M., van Breemen, C., McManus, B. M., and Dubé, G.P. (2001) Hepatic over-expression of PPARgamma2 in the *ob/ob* mouse model of non-insulin dependent diabetes mellitus. *Mol. Cell. Biochem.* **224**, 29–37
  11. Yu, S., Matsusue, K., Kashireddy, P., Cao, W. Q., Yeldandi, V., Yeldandi, A. V., Rao, M. S., Gonzalez, F. J., and Reddy, J. K. (2003) Adipocyte-specific gene expression and adipogenic steatosis in the mouse liver due to PPARgamma1 overexpression. *J. Biol. Chem.* **278**, 498–505
  12. Gavrilova, O., Haluzik, M., Matsusue, K., Cutson, J. J., Johnson, L., Dietz, K. R., Nicol, C. J., Vinson, C., Gonzalez, F. J., and Reitman, M. L. (2003) Liver PPARgamma contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass. *J. Biol. Chem.* **278**, 34268–34276
  13. Matsusue, K., Haluzik, M., Lambert, G., Yim, S. H., Gavrilova, O., Ward, J. M., Brewer, B. Jr., Reitman, M. L., and Gonzalez, F. J. (2003) Liver-specific disruption of PPARgamma in leptin-deficient mice improves fatty liver but aggravates diabetic phenotypes. *J. Clin. Invest.* **111**, 737–747
  14. Zhang, Y. L., Hernandez-Ono, A., Siri, P., Weisberg, S., Conlon, D., Graham, M. J., Crooke, R. M., Huang, L. S., and Ginsberg, H. N. (2006) Aberrant hepatic expression of PPARgamma2 stimulates hepatic lipogenesis in a mouse model of obesity, insulin resistance, dyslipidemia, and hepatic steatosis. *J. Biol. Chem.* **281**, 37603–37615
  15. Schadinger, S. E., Bucher, N. L., Schreiber, B. M., and Farmer, S. R. (2005) PPARgamma2 regulates lipogenesis and lipid accumulation in steatotic hepatocytes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **288**, E1195–E1205
  16. Ratziu, V., Giral, P., Jacqueminet, S., Charlotte, F., Hartemann-Heurtier, A., Serfaty, L., Podevin, P., Lacorte, J.M., Bernhardt, C., Bruckert, E., Grimaldi, A., and Poynard, T.; LIDO Study Group. (2008) Rosiglitazone for nonalcoholic steatohepatitis: one-year results of the randomized placebo-controlled Fatty Liver Improvement with Rosiglitazone Therapy (FLIRT) trial. *Gastroenterology* **135**, 100–110
  17. Ratziu, V., Charlotte, F., Bernhardt, C., Giral, P., Halbron, M., Lenaour, G., Hartmann-Heurtier, A., Bruckert, E., and Poynard, T.; LIDO Study Group. (2010) Long-term efficacy of rosiglitazone in nonalcoholic steatohepatitis: results of the Fatty Liver Improvement by Rosiglitazone Therapy (FLIRT 2) extension trial. *Hepatology* **51**, 445–453
  18. Jou, J., Choi, S. S., and Diehl, A. M. (2008) Mechanisms of disease progression in nonalcoholic fatty liver disease. *Semin. Liver Dis.* **28**, 370–379
  19. Lanthier, N., Molendi-Coste, O., Horsmans, Y., van Rooijen, N., Cani, P. D., and Leclercq, I. A. (2010) Kupffer cell activation is a causal factor for hepatic insulin resistance. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **298**, G107–G116
  20. Stienstra, R., Saudale, F., Duval, C., Keshkar, S., Groener, J. E., van Rooijen, N., Stael, B., Kersten, S., and Müller, M. (2010) Kupffer cells promote hepatic steatosis via interleukin-1beta-dependent suppression of PPARalpha activity. *Hepatology* **51**, 511–522
  21. Huang, W., Metlakunta, A., Dedousis, N., Zhang, P., Sipula, I., Dube, J. J., Scott, D. K., and O'Doherty, R. M. (2010) Depletion of liver Kupffer cells prevents the development of diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. *Diabetes* **59**, 347–357
  22. He, W., Barak, Y., Hevener, A., Olson, P., Liao, D., Le, J., Nelson, M., Ong, E., Olefsky, J. M., and Evans, R. M. (2003) Adipose-specific PPARgamma knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 15712–15717
  23. Postic, C., Shiota, M., Niswender, K. D., Jetton, T. L., Chen, Y., Moates, J. M., Shelton, K.D., Lindner, J., Cherrington, A. D., and Magnuson, M. A. (1999) Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic beta cell-specific gene knock-outs using Cre recombinase. *J. Biol. Chem.* **274**, 305–315
  24. Clausen, B. E., Burkhardt, C., Reith, W., Renkawitz, R., and Forster, I. (1999) Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res.* **8**, 265–277
  25. Martínez-Clemente, M., Ferré, N., González-Pérez, A., López-Parra, M., Horrillo, R., Titos, E., Morán-Salvador, E., Miquel, R., Arroyo, V., Funk, C. D., and Clària, J. (2010) 5-lipoxygenase deficiency reduces hepatic inflammation and TNFalpha-induced hepatocyte damage in hyperlipidemia-prone ApoE-null mice. *Hepatology* **51**, 817–827
  26. Cheung, O., and Sanyal, A. J. (2008) Abnormalities of lipid metabolism in nonalcoholic fatty liver disease. *Semin. Liver Dis.* **28**, 351–359
  27. Fabbri, E., Sullivan, S., and Klein, S. (2010) Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology* **51**, 679–689
  28. Edvardsson, U., Ljungberg, A., and Oscarsson, J. (2006) Insulin and oleic acid increase PPARgamma2 expression in cultured mouse hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **340**, 111–117
  29. Ramadori, G., Moriconi, F., Malik, I., and Dudas, J. (2008) Physiology and pathophysiology of liver inflammation, damage and repair. *J. Physiol. Pharmacol.* **59**(Suppl. 1), 107–117
  30. Clementi, A. H., Gaudy, A. M., van Rooijen, N., Pierce, R. H., and Mooney, R. A. (2009) Loss of Kupffer cells in diet-induced obesity is associated with increased hepatic steatosis, STAT3 signaling, and further decreases in insulin signaling. *Biochim. Biophys. Acta* **1792**, 1062–1072
  31. Hevener, A. L., Olefsky, J. M., Reichart, D., Nguyen, M. T., Bandyopadhyay, G., Leung, H. Y., Watt, M. J., Benner, C., Febbraio, M. A., Nguyen, A. K., Folian, B., Subramaniam, S., Gonzalez, F. J., Glass, C. K., and Ricote, M. (2007) Macrophage PPARgamma is required for normal skeletal muscle and hepatic insulin sensitivity and full antidiabetic effects of thiazolidinediones. *J. Clin. Invest.* **117**, 1658–1669
  32. Klassen, L. W., Thiele, G. M., Duryee, M. J., Schaffert, C. S., DeVeney, A. L., Hunter, C. D., Olinga, P., and Tuma, D. J. (2008) An in vitro method of alcoholic liver injury using precision-cut liver slices from rats. *Biochem. Pharmacol.* **76**, 426–436
  33. Sugii, S., Olson, P., Sears, D. D., Saberi, M., Atkins, A. R., Barish, G. D., Hong, S. H., Castro, G. L., Yin, Y. Q., Nelson, M. C., Hsiao, G., Greaves, D. R., Downes, M., Yu, R. T., Olefsky, J. M., and Evans, R. M. (2009) PPARgamma activation in adipocytes is sufficient for systemic insulin sensitization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 22504–22509
  34. Norris, A. W., Chen, L., Fisher, S. J., Szanto, I., Ristow, M., Jozsi, A. C., Hirshman, M. F., Rosen, E. D., Goodyear, L. J., Gonzalez, F. J., Spiegelman, B. M., and Kahn, C. R. (2003) Muscle-specific PPARgamma-deficient mice develop increased adiposity and insulin resistance but respond to thiazolidinediones. *J. Clin. Invest.* **112**, 608–618
  35. Hevener, A. L., He, W., Barak, Y., Le, J., Bandyopadhyay, G., Olson, P., Wilkes, J., Evans, R. M., and Olefsky, J. (2003) Muscle-specific Pparg deletion causes insulin resistance. *Nat. Med.* **9**, 1491–1497
  36. Marra, F., Efsen, E., Romanelli, R. G., Caligiuri, A., Pastacaldi, S., Batignani, Bonacchi, G., A., Caporale, R., Laffi, G., Pinzani, M., and Gentilini, P. (2000) Ligands of PPARgamma modulate profibrogenic and proinflammatory actions in hepatic stellate cells. *Gastroenterology* **119**, 466–478
  37. Ceni, E., Crabb, D. W., Foschi, M., Mello, T., Tarocchi, M., Patussi, V., Moraldi, L., Moretti, R., Milani, S., Surrenti, C., and Galli, A. (2006) Acetaldehyde inhibits PPARgamma via H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated c-Abl activation in human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* **131**, 1235–1252
  38. Tsukamoto, H., She, H., Hazra, S., Cheng, J., and Wang, J. (2008) Fat paradox of steatohepatitis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **23**(Suppl. 1), S104–S107
  39. Enomoto, N., Takei, Y., Hirose, M., Konno, A., Shibuya, T., Matsuyama, S., Suzuki, S., Kitamura, K. I., and Sato, N. (2003) Prevention of ethanol-induced liver injury in rats by an agonist of PPARgamma, pioglitazone. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **306**, 846–854
  40. 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
  41. Yu, J., Zhang, S., Chu, E. S., Go, M. Y., Lau, R. H., Zhao, J., Wu, C. W., Tong, L., Zhao, J., Poon, T. C., and Sung, J. J. (2010) PPARgamma reverses hepatic nutritional fibrosis in mice and suppresses activation of hepatic stellate cells in vitro. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **42**, 948–957

Received for publication October 6, 2010.

Accepted for publication April 7, 2011.



## **ARTÍCULO 2**

### **“La deficiencia celular específica de PPAR $\gamma$ establece propiedades antiinflamatorias y antifibrogénicas para este receptor nuclear en las células no parenquimales del hígado”**

Morán-Salvador E et al, *J of Hepatol* 2013. doi: 10.1016/j.jhep.2013.06.023

El daño hepático crónico producido por el modelo de tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>) reduce la expresión de PPAR $\gamma$ 1 mientras que aumenta la expresión de PPAR $\gamma$ 2 en el hígado (Figura Suplementaria 1 y Figura 1 del Artículo 2)

A través del modelo crónico de daño hepático inducido por CCl<sub>4</sub> (1 ml/kg peso corporal) durante 8 semanas hemos comprobado si PPAR $\gamma$  actúa como regulador del eje de inflamación/fibrosis en las diferentes células del hígado. La exposición al modelo hepatotóxico crónico incrementa de forma notable el área teñida con Oil Red-O (esteatosis), aumenta el número de focos inflamatorios al mismo tiempo que se observa una marcada fibrosis (Sirius Red) y el incremento de los niveles séricos de transaminasas en el grupo expuesto a CCl<sub>4</sub> comparado con el grupo control tratado con aceite (Fig Suplementaria 1 A y B).

En paralelo al fenotipo de daño hepático, se observó durante el transcurso del modelo crónico de CCl<sub>4</sub> una pérdida gradual a nivel proteico de la isoforma PPAR $\gamma$ 1 en el hígado, mientras que la expresión proteica de la isoforma adipogénica PPAR $\gamma$ 2 se mantuvo durante la exposición a CCl<sub>4</sub>, incrementando los niveles en la octava semana de tratamiento. Esta observación corresponde a la respuesta esteatogénica frente el daño hepático también observado en hepatocitos primarios incubados con ácido oleico (Fig 1A y Fig Suplementaria 1D).

La eliminación selectiva de PPAR $\gamma$  en los macrófagos agrava el daño inflamatorio provocado por el modelo crónico de CCl<sub>4</sub> (Figura 1 del Artículo 2).

Hemos analizado el papel que ejerce PPAR $\gamma$  en las respuestas inflamatorias y fibrogénicas de las células hepáticas a través de la eliminación específica de PPAR $\gamma$  en hepatocito (albumina-Cre) o

macrófago (lisozima M-Cre) en ratones heterocigotos para un alelo floxeado y el otro alelo truncado del gen de PPAR $\gamma$  ( $\gamma^{f/-}$ ) (Fig 1 B y C). La expresión génica de las dos isoformas de PPAR $\gamma$  está reducida significativamente en los diferentes tipos celulares de estudio respecto los ratones control (CT, heterocigotos floxeados en PPAR $\gamma$ ). Comprobamos la eficacia de delección producida por la recombinasa Cre en hepatocitos y macrófagos peritoneales aislados de ratones KO condicionales heterocigoto floxeados en PPAR $\gamma$  de hepatocito y macrófago, respectivamente (Fig 1C).

Los ratones tratados con CCl<sub>4</sub> durante 8 semanas presentaron daño hepático severo al analizar las tinciones de hematoxilina-eosina (H&E). La arquitectura lobular y sinusoidal del hígado se vio alterada por la extensión de la inflamación, degeneración hidrópica en las zonas centrilobulares y los puentes de necrosis hepatocitaria (Fig 1D). El daño hepático fue superior en los ratones deficientes de PPAR $\gamma$  específicamente en macrófago; se observó una marcada alteración de la estructura hepática y infiltrado inflamatorio mayor, en paralelo con el ascenso significativo de AST en suero y la sobreexpresión de COX-2, TNF- $\alpha$  y las citoquinas CXCL2 y IL-1 $\beta$  en el hígado de los ratones KO condicional de PPAR $\gamma$  en macrófago respecto los ratones CT (Fig 1D-F). Mientras que no se observaron cambios en IL-6 y MCP-1 en ausencia de PPAR $\gamma$  en macrófago, los ratones condicionales de PPAR $\gamma$  en hepatocito presentaron incremento en AST sérica y en la expresión hepática de IL-1 $\beta$  (Fig 1 E y F). No se observaron cambios significativos en los niveles séricos de ALT.

La delección de PPAR $\gamma$  en macrófago induce un daño hepatocelular superior frente al modelo crónico de CCl<sub>4</sub> (Figura 2 del Artículo 2).

A continuación se analizó las consecuencias de la ausencia de PPAR $\gamma$  en los efectos derivados del modelo de daño hepático como el estrés oxidativo y la supervivencia de los hepatocitos.

Debido a que el tratamiento crónico con CCl<sub>4</sub> genera estrés oxidativo evaluamos el grado de peroxidación lipídica originada a través del aducto 4-hidroxinonenal (4-HNE). La ausencia de PPAR $\gamma$  en los hepatocitos y en los macrófagos causó el incremento de los aductos 4-HNE en el

hígado de los dos tipos de colonias de KO. En paralelo, en ambas colonias se observó un descenso en la actividad del factor nuclear NF- $\kappa$ B, clave en la supervivencia del hepatocito (Fig 2 A y B). En cambio, al evaluar la apoptosis celular y la respuesta hepática únicamente observamos aumento de la actividad caspasa 3 y del infiltrado inflamatorio (tinción positiva del marcador de superficie de macrófagos F4/80) en el hígado de los ratones deficientes de PPAR $\gamma$  en macrófago (Fig 2 C y D).

La ausencia de PPAR $\gamma$  en los macrófagos produce mayor fibrogénesis en el modelo crónico de CCl<sub>4</sub> (Figura 2 del Artículo 2).

Al comprobar la acción fibrogénica del modelo CCl<sub>4</sub> se evaluó el grado de fibrosis determinando el contenido de colágeno hepático a través de las tinciones de Sirius Red y tricrómica de Masson. Los ratones deficientes de PPAR $\gamma$  en macrófago presentan una marcada fibrosis con extensas deposiciones de colágeno y puentes fibróticos entre los espacios portales así como un elevado contenido de hidroxiprolina en el hígado (utilizado como marcador de contenido de colágeno) (Fig 2 E y F). Además en el hígado de los ratones deficientes de PPAR $\gamma$  en macrófago se detectó sobreexpresión de los genes fibrogénicos  $\alpha$ -SMA y TIMP-1 respecto los ratones CT. No se detectaron cambios en la metaloproteinasa 2 (MMP-2) y TGF- $\beta$  (Fig 2G).

La supresión de PPAR $\gamma$  en las células de Kupffer empeora la respuesta inflamatoria frente al LPS en cultivos órganotípicos (Figura 3 del Artículo y Anexo I Figura I).

Realizamos experimentos en cultivos de cortes de alta precisión de hígado para confirmar la función antiinflamatoria de PPAR $\gamma$  concretamente en los macrófagos del hígado (células de Kupffer). Los cultivos órganotípicos de hígado fresco permiten excluir la influencia de factores extrahepáticos en circulación y analizar la respuesta inflamatoria hepática al exponer el tejido durante 18h a lipopolisacáridos de membrana de bacterias Gram-negativas (LPS) (100  $\mu$ g/ml), de esta forma se induce la activación las células de Kupffer (CK) (Fig 3 A y B).

Tras exponer los cultivos organotípicos de hígado de ratones CT y deficientes de PPAR $\gamma$  en macrófago a LPS se detectó una respuesta inflamatoria aguda y empeorada debido a la ausencia de PPAR $\gamma$  en las CK. Los cultivos de hígado de ratones KO en macrófago presentaron un aumento significativo de IL-6, COX-2 y daño hepático superior en el tejido (aumento en los niveles de ALT y LDH en el medio de cultivo) respecto los cultivos organotípicos de ratones CT (Fig 3 C y D). Acorde con la inducción observada de los marcadores de pro-inflamación M1, la expresión de los marcadores anti-inflamatorios M2 fue mitigada y reducida significativamente en IL-10 en los cultivos de hígado deficientes de PPAR $\gamma$  en CK (Fig 3F). En cambio, los cultivos organotípicos de hígado deficientes de PPAR $\gamma$  en hepatocito no mostraron respuesta pro-inflamatoria exacerbada, sino que fue similar a la de los cultivos procedentes de CT pero con menor daño hepático al disminuir la secreción de ALT y LDH (Anexo I Fig I). La incubación de los hígados CT con el agonista rosiglitazona (10  $\mu$ M) redujo significativamente la respuesta inflamatoria de TNF- $\alpha$  y IL-1 $\beta$  frente LPS, en cambio esta acción anti-inflamatoria desapareció parcialmente en los cultivos de hígado deficientes de PPAR $\gamma$  en macrófago (Fig 3E).

La supresión de PPAR $\gamma$  en macrófagos ocasiona mayor daño hepático frente a una agresión aguda con CCl $_4$  (Figura Suplementaria 2 del Artículo y Anexo I Figura II).

Al someter los ratones KO condicionales de PPAR $\gamma$  en macrófago a un daño hepático agudo inducido por una única dosis de CCl $_4$  (0.5 ml/kp peso corporal) se observó una respuesta nociva más pronunciada respecto al observado en los ratones CT sujetos a CCl $_4$  24h (Fig Suplementaria 2). No se observaron diferencias en el estado inflamatorio basal entre los ratones CT y deficientes de PPAR $\gamma$  en macrófago (Fig Suplementaria 2). El daño hepático agudo no provocó respuesta inflamatoria agravada en los ratones deficientes de PPAR $\gamma$  en hepatocito respecto los CT, aunque si mostraron niveles inferiores de transaminasas (Anexo I Fig II).

La delección de PPAR $\gamma$  en células hepáticas estrelladas intensifica el daño hepático e induce más fibrogénesis en el modelo crónico de CCl<sub>4</sub> (Figura 4 del Artículo 2).

En la patogénesis de la fibrosis hepática las CEH participan activamente en la progresión de la enfermedad, por ello comprobamos el papel que ejerce PPAR $\gamma$  en dichas células. Aunque no existe un promotor que específicamente exprese la recombinasa Cre en las CEH, utilizamos el promotor del gen de  $\alpha$ P2 o también conocida como proteína 4 de unión a AG (FABP4) basándonos en la fenotipo quiescente de las CEH (Fig 4A). Después de aislar y purificar células primarias de hígado de ratón, comprobamos que la expresión de  $\alpha$ P2 predomina principalmente en las CEH en quiescencia y su expresión se mantiene constante durante el proceso de transdiferenciación o activación de las CEH (Fig 4B-D). También observamos que la isoforma 2 de PPAR $\gamma$  se expresa principalmente en CEH pero en menor cantidad en hepatocitos aislados, y que la expresión de ambas isoformas de PPAR $\gamma$  fue suprimida durante la activación de las estrelladas (Fig 4 C y D). Tal y como se esperaba, los adipocitos seguidos por los macrófagos periféricos expresan tanto  $\alpha$ P2 como PPAR $\gamma$  (Fig Suplementaria 4).

Para asegurar la ausencia de PPAR $\gamma$  en las CEH quiescentes así como distinguir la posible inhibición de PPAR $\gamma$  en las CK de los ratones KO, aislamos y purificamos dichas células del hígado de ratones CT y deficientes de PPAR $\gamma$  en CEH. Al comprobar por inmunocitoquímica los niveles de proteína se observó mayor contenido proteico de PPAR $\gamma$  en CEH quiescente respecto el detectado en CK en los ratones CT. La expresión de PPAR $\gamma$  en CEH quiescentes de ratones KO condicionales en CEH se suprimió comparada con la señal observada en el CT, mientras se redujo ligeramente en CK de ratones KO en CEH. La expresión de PPAR $\gamma$  desapareció en las CEH activadas (Fig 4E). Los ratones deficientes de PPAR $\gamma$  en CEH presentaron lipodistrofia e intolerancia a la glucosa pero sin mostrar alteraciones en el estado inflamatorio y fibrogénico basal (Fig Suplementaria 4). Al someter los ratones al modelo crónico de daño hepático, la ausencia de PPAR $\gamma$  en las CEH provocó una respuesta fibrogénica exacerbada a nivel de daño hepatocelular (ascenso de AST y ALT), contenido superior de fibras de colágeno en hígado (cantidad de hidroxiprolina y área positiva en

Sirius red/tricrómico de Masson) y sobreexpresión de los genes fibrogénicos  $\alpha$ -SMA y TIMP-1 respecto los ratones CT (Fig 5 F-I).

El papel antiinflamatorio y antifibrogénico de PPAR $\gamma$  en las células no parenquimales también se confirmó en ratones condicionales homocigoto floxeados en PPAR $\gamma$  (Anexo I Figuras III, IV y V)

Concretamente los ratones deficientes de PPAR $\gamma$  específicamente en célula fueron generados a partir de la tecnología Cre-loxP en ratones con dos tipos de genotipos: homocigotos para el gen floxeado de PPAR $\gamma$  ( $\gamma^{f/f}$ ) o heterocigotos para un alelo floxeado y el otro alelo truncado ( $\gamma^{f/-}$ ). De esta forma y después de producir los cruces adecuados en cada colonia, se obtuvieron 4 genotipos de entre los que se encuentran 2 tipos de KO condicional de PPAR $\gamma$  de cada tipo celular diana (en particular  $\gamma^{f/f} \Delta_{hep}$  y  $\gamma^{f/-} \Delta_{hep}$  para hepatocito,  $\gamma^{f/f} \Delta_{mac}$  y  $\gamma^{f/-} \Delta_{mac}$  para macrófago y,  $\gamma^{f/f} \Delta_{hsc}$  y  $\gamma^{f/-} \Delta_{hsc}$  para CEH) (ver Anexo I Figura III A y B).

A partir del análisis de la respuesta producida por los todos los genotipos frente el daño crónico inducido por el CCl $_4$  se identificó un fenotipo claramente más afectado y con daño hepático mayor en los ratones control heterocigoto floxeados en PPAR $\gamma$  ( $\gamma^{f/-}$ ) respecto los ratones control homocigoto floxeados en PPAR $\gamma$  ( $\gamma^{f/f}$ ). En el Anexo I Figura III C y III D se puede observar como el genotipo f/- presenta deterioro de la arquitectura hepática lobular con infiltrado inflamatorio mayor y aumento superior de la actividad transaminasa AST. Por este motivo, en el estudio se ha profundizado en el análisis del genotipo heterocigoto floxeado en los KO condicionales de PPAR $\gamma$  (Fig 1 B y C).

Al analizar el genotipo homocigoto floxeado también se detectó daño hepático y una respuesta inflamatoria más severa en los ratones deficientes de PPAR $\gamma$  en los macrófagos respecto los ratones control (CT $^{f/f}$ ). En concreto, se observa infiltrado a nivel histológico mayor (H&E y F4/80 positivos) junto con el aumento en la expresión hepática de COX-2 (Anexo I Figuras IV). Además, tras someter los ratones al modelo crónico de CCl $_4$ , la ausencia de PPAR $\gamma$  en los macrófagos o las CEH causa una mayor respuesta fibrogénica aunque ligeramente más agravada en los ratones



deficientes de PPAR $\gamma$  en los macrófagos (área positiva de tinción en Sirius Red y la expresión de TIMP-1, ver Anexo I Figura V).



**Cell-specific PPAR $\gamma$  deficiency establishes antiinflammatory and antifibrogenic properties for this nuclear receptor in non-parenchymal liver cells**

Eva Morán-Salvador<sup>1</sup>, Esther Titos<sup>1,4</sup>, Bibiana Rius<sup>1</sup>, Ana González-Pérez<sup>1,4</sup>, Verónica García-Alonso<sup>1</sup>, Cristina López-Vicario<sup>1</sup>, Rosa Miquel<sup>2</sup>, Yaacov Barak<sup>6</sup>, Vicente Arroyo<sup>3,4</sup> and Joan Clària<sup>1,4,5</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Molecular Genetics, <sup>2</sup>Department of Pathology and <sup>3</sup>Liver Unit, Hospital Clínic-IDIBAPS-Esther Koplowitz Center; <sup>4</sup>CIBERehd; and <sup>5</sup>Department of Physiological Sciences I, University of Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>6</sup>Magee-Womens Research Institute, Department of OBGYN and Reproductive Sciences, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, USA

**Corresponding Author:** Dr. Joan Clària, 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](mailto:jclaria@clinic.ub.es)

**Electronic word count:** 5.012

**Number of figures:** 4

**Abbreviations:** PPAR $\gamma$ , peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ; TZD, thiazolidinediones; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor  $\alpha$ ; IL, interleukin; HSCs, hepatic stellate cells; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; CCl<sub>4</sub>, carbon tetrachloride; LPS, lipopolysaccharide; PCLS, precision-cut liver slices; Alb-Cre, albumin-Cre (hepatocyte-specific PPAR $\gamma$  deficient mice); LysM-Cre, lysozyme M-Cre (macrophage-specific PPAR $\gamma$  deficient mice); aP2-Cre, adipocyte fatty acid-binding protein 4-Cre (HSC-specific PPAR $\gamma$  deficient mice); LDH, lactate dehydrogenase; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; NF- $\kappa$ B, nuclear factor- $\kappa$ B; 4-HNE, 4-hydroxynonenal

**Conflict of Interest:** None

**Financial Support:** Supported by grants from the Ministerio de Economía y Competitividad (SAF 09/08767 and SAF 12/32789). CIBERehd is funded by the Instituto de Salud Carlos III. Our laboratory is a Consolidated Research Group recognized by the Generalitat de Catalunya (2009SGR1484). This work was carried out at the Esther Koplowitz Center, Barcelona. E.M-S. was supported by Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) (AP2007-02004). E.T. and A.G-P. had contracts with CIBERehd. C.L-V. and V.G-A. were supported by IDIBAPS and MICINN (BES-2010-034193), respectively.

**ABSTRACT**

**Background & Aims:** PPAR $\gamma$  plays an essential role in the transcriptional regulation of genes involved in lipid and glucose metabolism, insulin sensitivity and inflammation. We recently demonstrated that PPAR $\gamma$  plays a causative role in hepatocyte lipid deposition, contributing to the pathogenesis of hepatic steatosis. In this study, we investigated the role of PPAR $\gamma$  in the inflammatory and fibrogenic response of the liver.

**Methods:** Heterozygous floxed/null Cre/LoxP mice with targeted deletion for PPAR $\gamma$  in either hepatocytes (Alb-Cre), macrophages (LysM-Cre) or hepatic stellate cells (HSCs) (aP2-Cre), were submitted to carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) liver injury. Further analysis were performed in precision-cut liver slices (PCLS) and primary cultures of hepatocytes, macrophages and HSCs.

**Results:** LysM-Cre mice displayed an exacerbated response to chronic CCl<sub>4</sub> injury and showed higher necroinflammatory injury, lipid peroxidation, inflammatory infiltrate, cleaved-caspase-3 and caspase 3/7 activity, and COX-2, TNF- $\alpha$ , CXCL2 and IL-1 $\beta$  expression than Alb-Cre and control mice. The deleterious effects of PPAR $\gamma$  disruption in liver macrophages were confirmed in an acute model of CCl<sub>4</sub> injury as well as in PCLS incubated with LPS. Moreover, LysM-Cre mice showed an aggravated fibrogenic response to CCl<sub>4</sub>, as revealed by more prominent Sirius Red and Masson's trichrome staining, elevated hydroxyproline content and induced  $\alpha$ -SMA and TIMP-1 expression. Importantly, aP2-Cre mice with specific disruption of PPAR $\gamma$  in HSCs, as confirmed by immunocytochemical analysis of individual liver cells, also showed exacerbated liver damage and fibrogenic response to CCl<sub>4</sub>.

**Conclusion:** These data unveil antiinflammatory and antifibrogenic roles for PPAR $\gamma$  in non-parenchymal liver cells.

**Abstract word count:** 244

**Keywords:** PPAR $\gamma$ , Kupffer cells, hepatic stellate cells, hepatocytes, inflammation, fibrosis

## INTRODUCTION

There is strong evidence that peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\gamma$  is a fundamental transcription factor controlling anabolic functions such as adipogenesis, fat deposition and insulin sensitivity [1]. A large amount of literature also implicates PPAR $\gamma$  in the regulation of inflammatory response [2]. Indeed, PPAR $\gamma$  ligands such as thiazolidinediones (TZD) have been shown to inhibit the production of inflammatory cytokines including tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-1 $\beta$  and IL-6 in monocytes, macrophages and epithelial cells [2]. Consistent with these properties, administration of PPAR $\gamma$  ligands to experimental models has been shown to ameliorate inflammation in the pancreas, lungs, joints, nervous system and gastrointestinal tract [1].

The role of PPAR $\gamma$  in the regulation of hepatic inflammatory and fibrogenic response is still an open question. While *in vitro* findings postulate PPAR $\gamma$  as antiinflammatory and antifibrogenic, *in vivo* studies do not clearly establish this. Indeed, initial discoveries in hepatic stellate cells (HSCs) demonstrated that PPAR $\gamma$  expression and transcriptional activity were dramatically reduced during the transdifferentiation process from a quiescent to an activated/fibrogenic myofibroblast-like phenotype [3,4]. Accordingly, synthetic PPAR $\gamma$  ligands, adenovirus-mediated ectopic expression of PPAR $\gamma$  or epigenetic PPAR $\gamma$  derepression achieved the phenotypic reversal from activated HSCs to the quiescent phenotype [4-6]. Consistent with these findings, administration of synthetic TZDs effectively exerted preventive actions of early inflammatory and fibrogenic response in different animal models of liver injury [7]. However, the therapeutic efficacy of TZDs appears to be limited and dependent on the type of injury, duration of disease and/or the severity of fibrosis at the time of initiation of treatment [8]. Moreover, the pharmacological actions of TZDs seem to be also PPAR $\gamma$ -independent [9,10]. Overall, these studies indicate that the precise role of PPAR $\gamma$  in hepatic inflammation and fibrosis is still controversial.

In the current study we further explored the role of PPAR $\gamma$  in liver inflammation and fibrosis by using the Cre-*loxP* system to specifically target individual liver cell types, namely hepatocytes,

macrophages, represented in the liver as Kupffer cells, and HSCs. Our results reveal that specific disruption of PPAR $\gamma$  in macrophages and, to a lesser extent, in HSCs, exacerbates the inflammatory and fibrogenic response to carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>). The contribution of non-parenchymal cell PPAR $\gamma$  in controlling the hepatic inflammation-fibrosis axis was confirmed in lipopolysaccharide (LPS)-treated precision-cut liver slices (PCLS), which allow direct assessment of liver cells in the absence of extrahepatic and circulating factors. Considering that we recently identified PPAR $\gamma$  as a prosteatotic factor in parenchymal liver cells (i.e. hepatocytes) [11], the current findings demonstrating antiinflammatory and antifibrogenic properties for PPAR $\gamma$  in non-parenchymal cells suggest the existence of divergent roles for hepatic PPAR $\gamma$  in the pathogenesis of liver injury.

## MATERIAL AND METHODS

**Mouse colonies:** Because of their more distinguishable phenotype, the study was performed in heterozygous floxed/null PPAR $\gamma$  deficient mice harboring one loxP-targeted PPAR $\gamma$  allele (flanking exons 1 and 2) and a blunted PPAR $\gamma$  allele by the in-frame insertion of a LacZ-cassette (exon 2). These mice were crossed with transgenic mice expressing Cre recombinase under the control of either the albumin promoter (Alb-Cre), the myeloid-specific lysozyme M promoter (LysM-Cre) or the adipocyte fatty acid-binding protein 4 promoter (aP2-Cre) to generate mice with a specific targeted deletion of PPAR $\gamma$  in hepatocytes (Alb-Cre) (n=16), macrophages (LysM-Cre) (n=16) or HSCs (aP2-Cre) (n=8), respectively [12-15]. These mice are predicted to lose PPAR $\gamma$  isoform 1 (PPAR $\gamma$ 1) and a nonfunctional N-terminal, 43-aminoacid translational product of PPAR $\gamma$  isoform 2 (PPAR $\gamma$ 2) that misses the partial AF1 domain and the first zinc finger of the DNA binding domain [13]. Heterozygous floxed/null mice were used as controls (CT). Mice breeding and DNA genotyping was performed as described in **Supplementary Material and Methods**.

**Acute and chronic models of liver injury:** Acute and chronic liver injury was induced as described in **Supplementary Material and Methods**. All animal studies were conducted in accordance with the criteria of the Investigation and Ethics Committee of the Hospital Clínic and the EU laws governing the use of experimental animals.

**Histological analysis and detection of F4/80 by immunohistochemistry:** Necroinflammatory injury, hepatic steatosis, hepatic fibrosis and the detection of F4/80, a specific marker of murine tissue macrophages were assessed as described in **Supplementary Material and Methods**.

**Hepatic hydroxyproline content:** Hydroxyproline content was quantified as described in **Supplementary Material and Methods**.

**Biochemical analysis:** LDH, ALT and AST levels were determined by standard laboratory procedures.

***Isolation and culture of liver cells:*** Hepatocytes, Kupffer cells and HSCs were isolated as described in **Supplementary Material and Methods**.

***Isolation and culture of peritoneal macrophages and adipocytes:*** Resident peritoneal macrophages and adipocytes from wild-type mice were isolated as described [16] (**Supplementary Material and Methods**).

***PCLS:*** Organotypic cultures of liver slices from 22-week-old CT (n=8), Alb-Cre (n=3) and LysM-Cre (n=6) mice were performed as described [11] (**Supplementary Material and Methods**). Liver slices were pre-incubated at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator for 90 min before treatments and then incubated for 18 h with either vehicle (DPBS<sup>-/-</sup>), LPS (100 µg/ml) (Sigma), rosiglitazone (10 µM) (Cayman Chemical, Ann Harbor, MI) and a combination of LPS and rosiglitazone. At the end of the incubation period, culture medium was collected to determine ALT and LDH levels and liver slices were snap-frozen in liquid nitrogen for gene expression analysis.

***Analysis of gene expression:*** RNA concentration, integrity and gene expression were assessed as described in **Supplementary Material and Methods**.

***Immunocytochemistry of PPAR $\gamma$  in primary liver cells:*** Quiescent HSCs placed on Cytospin slides or activated HSCs cultured for 9 days in 8-chamber Polystyrene Vessel Tissue Culture Slides (BD Falcon) isolated from CT and aP2-Cre mice were fixed-permeabilized in ice-cold methanol:acetone (1:1) and stained with a primary rabbit anti-mouse PPAR $\gamma$  antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) as detailed in **Supplementary Material and Methods**. Kupffer cells were enriched by attachment for 1 hour in Nunc Lab-Tek Chamber Slide system 8 wells Permanox Slide (Thermo Scientific, Waltham, MA), fixed, permeabilized and immunostained as described above.



***Analysis of PPAR $\gamma$  protein expression by Western blot:*** Nuclear extracts from mouse liver tissue were subjected to Western blot using primary rabbit anti-mouse PPAR $\gamma$  antibody (Santa Cruz Biotechnology) as detailed in **Supplementary Material and Methods**.

***Analysis of cleaved-caspase-3 by Western blot:*** Total liver protein was extracted using a modified RIPA buffer and subjected to Western blot using primary rabbit anti-mouse cleaved-caspase-3 and caspase-3 antibodies (Cell Signaling, Danvers, MA) (**Supplementary Material and Methods**).

***Analysis of caspase-3/7 activity by luminescent assay:*** Liver tissue was homogenized (Dounce homogenizer) in 1 ml of hypotonic extraction buffer containing 25 mM HEPES (pH 7.5), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA and protease inhibitors. Cytosolic fractions were clarified by centrifugation at 16,000 g for 15 min at 4°C. Protein supernatants were determined by Bradford protein assay (Bio-Rad Laboratories). Equal amounts of protein from liver samples were used to determine caspase-3/7 using the Caspase-Glo 3/7 assay (Promega, Madison, WI).

***Nuclear Factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) activity:*** NF- $\kappa$ B activity in liver tissue nuclear extracts was assessed using the Nuclear NF- $\kappa$ B (p65) Transcription Factor Assay Kit (Cayman Chemical) (**Supplementary Material and Methods**).

***4-hydroxynonenal (4-HNE) detection:*** Lipid peroxidation was determined as described in **Supplementary Material and Methods**.

Statistical analysis of the results was performed by analysis of variance (one-way or two way ANOVA) and the unpaired Student's *t* test. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. and differences were considered significant at  $P < 0.05$ .

## RESULTS

In this investigation, we used the CCl<sub>4</sub> model of chronic liver injury. As expected, following 8-week CCl<sub>4</sub> treatment the percentage of positive staining for Oil Red-O (steatosis) increased in parallel with the number of inflammatory foci (inflammation) and Sirius Red staining (fibrosis) as well as in serum transaminase levels as compared to oil-treated mice (**Supplementary Fig. 1A and B**). Over the course of the induction of liver injury, mice displayed a gradual loss of PPAR $\gamma$ 1 protein expression (**Fig. 1A**). In contrast, PPAR $\gamma$ 2 remained unchanged for most of the CCl<sub>4</sub> exposure, although it finally peaked at 8 weeks (**Fig. 1A**). The corresponding protein loading control for this Western blot is shown in **Supplementary Fig. 1C**. The rise in PPAR $\gamma$ 2 likely reflects the steatogenic response to liver injury because we confirmed in isolated hepatocytes that expression of this adipogenic isoform was induced by oleic acid (**Supplementary Fig. 1D**).

To test whether PPAR $\gamma$  is a regulator of the inflammation-fibrosis axis in liver cells, we generated mice with a specific targeted deletion of PPAR $\gamma$  in hepatocytes (Alb-Cre) and macrophages (LysM-Cre) by introducing Cre recombinase under the control of the albumin promoter or the LysM promoter, respectively, onto mice heterozygous for a floxed allele and a null allele of PPAR $\gamma$  (**Fig. 1B**). PCR genotyping confirmed a 200-bp band corresponding to the floxed PPAR $\gamma$  allele (F1 and R1 primers) together with 160-bp and 230-bp bands corresponding to the null PPAR $\gamma$  allele (F2 and R2 primers) in CT mice (**Fig. 1B and C**). The respective cell-specific Cre recombinase transgenes were confirmed by the presence of floxed and null allele bands in combination with 700-bp (F3 and R3 primers) or 380-bp (F4 and R4 primers) bands corresponding to the Alb- or LysM-Cre recombinase, respectively (**Fig. 1C**). To test the efficiency of these Cre recombinase transgenes, we isolated hepatocytes and macrophages from Alb-Cre and LysM-Cre mice, respectively, as well as from CT mice and unequivocally demonstrated that the expression of both PPAR $\gamma$  isoforms was indeed reduced compared to CT mice (**Fig. 1C**). When Alb-Cre, LysM-Cre and CT mouse colonies were challenged with CCl<sub>4</sub>, a severe disruption of hepatic sinusoidal and lobular architecture characterized by extensive inflammation, ballooning at the centrilobular zone and bridging of necrosis was seen (**Fig. 1D**).

However, liver injury was more prominent in LysM-Cre mice, which exhibited worsened lobular architecture damage and progressive and larger inflammatory infiltrate than Alb-Cre and CT mice (**Fig. 1D**). Serum AST but not ALT levels correlated well with liver damage seen at the histological level (**Fig. 1E**). In addition, COX-2, TNF- $\alpha$ , chemokine (C-X-C motif) ligand 2 (CXCL2) and IL-1 $\beta$  were significantly up-regulated upon ablation of PPAR $\gamma$  in liver macrophages (**Fig. 1F**). IL-1 $\beta$  was also up-regulated in Alb-Cre mice. No changes were observed in IL-6 and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) expression.

We next analyzed the consequences of PPAR $\gamma$  ablation on hepatic oxidative stress, hepatocyte survival, inflammatory infiltrate and fibrogenic response to the chronic CCl<sub>4</sub> challenge. As shown in **Fig. 2A**, hepatic lipid peroxidation as measured by 4-HNE protein adducts was increased in both Alb-Cre and LysM-Cre mice. In addition, NF- $\kappa$ B, which plays a pivotal role in liver cell survival, was significantly reduced in both knockout colonies (**Fig. 2B**). However, increased cleaved-caspase-3 levels and elevated caspase 3/7 activity, indicative of enhanced cell apoptosis, were only evident in LysM-Cre mice (**Fig. 2C**). In addition, increased F4/80 positive staining was seen in LysM-Cre mice (**Fig. 2D**). LysM-Cre mice also presented exacerbated fibrosis as determined by the morphometric assessment of the total area with positive Sirius Red and Masson's trichrome staining (**Fig. 2E**) and by higher hepatic hydroxyproline content (**Fig. 2F**). Exacerbated fibrogenesis in these mice was accompanied by increased  $\alpha$ -SMA and TIMP-1 expression with no changes in MMP-2 and TGF- $\beta$  (**Fig. 2G**). Surprisingly, Alb-Cre mice showed slightly reduced caspase 3/7 activity and F4/80 immunostaining and increased TIMP-1 expression (**Fig. 2 C, D and G**).

To confirm the antiinflammatory role of PPAR $\gamma$  in hepatic macrophages in the absence of extrahepatic and circulating factors, we performed experiments in PCLS. By exposing tissue slices from wild-type mice to LPS, a potent inducer of Kupffer cell activation, we validated PCLS as a useful tool to study the inflammatory response in intact liver cells. As shown in **Fig. 3A-B**, LPS markedly up-regulated TNF- $\alpha$ , COX-2 and IL-6 expression and augmented ALT and LDH levels in the culture medium.

Notably, the response of PCLS from LysM-Cre mice was more intense than that observed in CT mice in terms of COX-2 and IL-6 expression (**Fig. 3C**). Moreover, PCLS from LysM-Cre mice showed higher ALT and LDH levels than those from CT mice (**Fig. 3D**). Exacerbated injury was not observed in PCLS from Alb-Cre mice (data not shown), in which ALT and LDH fold increases were even lower than those from CT slices (ALT:  $0.048 \pm 0.016$  vs  $0.275 \pm 0.086$ ,  $P < 0.05$  and LDH:  $0.084 \pm 0.028$  vs  $0.281 \pm 0.072$ ,  $P < 0.05$ ). Since PPAR $\gamma$  is a ligand-activated transcription factor, we also performed experiments with the specific PPAR $\gamma$  agonist rosiglitazone. As shown in **Fig. 3E**, rosiglitazone significantly decreased LPS-induced TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  expression in PCLS from CT mice. This anti-inflammatory action of rosiglitazone partially disappeared in PCLS from LysM-Cre mice (**Fig. 3E**). Furthermore, consistent with the higher induction of prototypic classically inflammatory activated M1 markers, tissue slices from LysM-Cre mice showed a reduction in the anti-inflammatory cytokine IL-10 and a blunted response in the alternatively activated M2 markers (**Fig. 3F**).

To further explore the hepatic damaging effects of PPAR $\gamma$  ablation in macrophages, we challenged mice with a single dose of CCl<sub>4</sub>, which reproduces acute liver injury. No differences in the basal “inflammatory status” (before CCl<sub>4</sub> challenge) were detected between LysM-Cre and CT mice (**Supplementary Fig. 2**). As expected, CCl<sub>4</sub> challenge strongly elevated serum transaminase levels and hepatic expression of COX-2, TNF- $\alpha$ , IL-6 and MCP-1, an hepatic damaging response that was more pronounced in LysM-Cre mice (**Supplementary Fig. 2**). In contrast, CCl<sub>4</sub> challenge did not produce exacerbated inflammatory response in Alb-Cre mice (data not shown), and even these mice presented lower AST levels than CT mice ( $577 \pm 83$  vs  $2492 \pm 612$  IU/L,  $P < 0.05$ ).

Finally, given that HSCs are central to the pathogenesis of liver fibrosis [17], we also sought to specifically inactivate PPAR $\gamma$  in these cells. In the absence of a specific HSC promoter, we carried out experiments in mice in which the Cre-loxP system is controlled by the  $\alpha$ P2 promoter (**Fig. 4A**).  $\alpha$ P2 is a gene with predominant expression in non-parenchymal liver cells, in particular in quiescent HSCs. Indeed, after purifying hepatocytes and sorting Kupffer cells and HSCs by flow cytometry (**Fig. 4B**),

we confirmed that most of hepatic  $\alpha$ 2 expression was ascribed to quiescent HSCs (**Fig. 4C**). PPAR $\gamma$  expression in the liver was also predominant in quiescent HSCs, being PPAR $\gamma$ 2 the relevant isoform in these cells (**Fig. 4C**). Expression of  $\alpha$ 2 remained constant during HSC transactivation, while PPAR $\gamma$ 1 and 2 were depleted (**Fig. 4D**). As expected, both  $\alpha$ 2 and PPAR $\gamma$  were robustly expressed in adipocytes and, to a lesser extent, in peripheral macrophages (**Supplementary Fig. 3**). To ensure distinction of PPAR $\gamma$  deletion in HSCs from that in Kupffer cells, these cells were isolated from CT mice and  $\alpha$ 2-Cre mice and PPAR $\gamma$  protein expression was monitored by immunocytochemistry. In CT mice, PPAR $\gamma$  signal was higher in quiescent HSCs than in Kupffer cells (**Fig. 4E**). As expected, expression of PPAR $\gamma$  was indeed reduced in quiescent HSCs from  $\alpha$ 2-Cre mice compared to those from CT mice, whereas it was only slightly reduced in Kupffer cells (**Fig. 4E**). Consistent with previous studies [3,4], PPAR $\gamma$  protein was significantly depleted in activated HSCs (**Fig. 4E**). Baseline phenotype analysis of  $\alpha$ 2-Cre mice revealed mild lipodystrophy and impaired glucose tolerance, as previously reported [13], without changes in the “inflammatory and fibrogenic status” (**Supplementary Fig. 4**). However, when  $\alpha$ 2-Cre mice were chronically challenged with CCl<sub>4</sub>, these mice presented exacerbated liver damage and increased fibrogenic response (**Fig. 4 F-I**).

## DISCUSSION

In the current investigation we performed a comprehensive analysis of the role of PPAR $\gamma$  in the pathogenesis of hepatic inflammation and fibrosis by specifically deleting PPAR $\gamma$  in individual liver cell types. Our study provides novel data demonstrating that PPAR $\gamma$  deficiency in non-parenchymal liver cells (i.e. Kupffer cells and HSCs) exacerbates CCl<sub>4</sub>-induced liver injury, postulating this nuclear factor as a protective factor against hepatic inflammation and fibrosis. With these findings, we were able to complement our previous results showing a steatotic role for PPAR $\gamma$  in parenchymal liver cells (i.e. hepatocytes) in a consolidated model of experimental non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [11]. Taken together, our novel findings suggest the existence of divergent cell-specific and even opposite roles for hepatic PPAR $\gamma$  in the pathogenesis of liver injury.

Targeted disruption of PPAR $\gamma$  under the control of the albumin and LysM promoters has been widely employed to achieve specific gene deletion in hepatocytes [11,14] and Kupffer cells [11,18]. In addition to monocytes/macrophages, the LysM promoter-driven Cre transgene targets other myeloid cell types such as neutrophils [15], which are also implicated in the hepatic inflammatory process [17]. In this regard, and in line with our findings, a recent investigation by Wu et al [19] has provided evidence that expression of a dominant negative PPAR $\gamma$  variant in myeloid cells causes severe inflammation and progressing to tumor development in different tissues/organs. On the other hand, despite the variety of promoters used to specifically target HSCs (i.e. collagen  $\alpha$ 1 (I), collagen  $\alpha$ 2 (I), desmin and glial fibrillar acidic protein), most have failed because are weak inducers of the Cre/loxP system and/or are also expressed in other unrelated cell types [20-22]. In our study, we circumvent this problem by disrupting PPAR $\gamma$  under the control of the  $\alpha$ P2 promoter. Our findings demonstrate that  $\alpha$ P2 is predominantly expressed in non-parenchymal liver cells and more specifically in HSCs. This finding differs from that of Beaven et al [23], who reported the absence of  $\alpha$ P2 expression in human HSCs, although these authors used LX-2 cells, a fully activated immortalized stellate cell line. Our findings also demonstrate that PPAR $\gamma$  protein expression was remarkably reduced in quiescent HSCs from  $\alpha$ P2-Cre mice, whereas the signal was only marginally reduced in Kupffer cells. In addition, we

were able to prove that aP2-Cre mice lacking PPAR $\gamma$  in HSCs develop exacerbated liver damage and increased fibrogenic response when chronically challenged with CCl<sub>4</sub>. Considering that aP2 is robustly expressed in adipocytes, PPAR $\gamma$  deficiency in adipose tissue may also produce remote systemic effects, leading, for instance, to macrophage polarization toward enhanced inflammatory M1 effects in the liver. Although the potential confounding effects of using the aP2 promoter-driven transgene need to be further delineated, Odegaard et al have recently shown that Kupffer cell polarization is mostly controlled by PPAR $\delta$  [24].

The results of the current investigation pose a number of intriguing observations. Firstly, we observed that PPAR $\gamma$ 1 was remarkably suppressed while in contrast, PPAR $\gamma$ 2 remained unchanged and finally peaked at 8 weeks after CCl<sub>4</sub> exposure. This unexpected increase in PPAR $\gamma$ 2, the isoform that primarily regulates lipogenesis [25], is plausible with the presence of hepatic steatosis in the injured liver. Secondly, we observed that PPAR $\gamma$  ablation in hepatocytes and macrophages significantly decreased NF- $\kappa$ B activity. This was unexpected because NF- $\kappa$ B regulates expression of inflammatory cytokines and its activity is transrepressed by PPAR $\gamma$ [26,27]. However, it is important to note that NF- $\kappa$ B plays paradoxical functions in liver cells as it provides a survival benefit [26]. In fact, increased cell apoptosis assessed by elevated cleaved-caspase-3 levels and caspase 3/7 activity was a signature of LysM-Cre mice. Moreover, IL-6 and IL-1 $\beta$ , which are NF- $\kappa$ B driven cytokines produced by M1 macrophages, were up-regulated in PCLS from macrophage-specific PPAR $\gamma$  knockout mice. Thirdly, in PCLS experiments, we observed that alternatively activated M2 markers did not change substantially, while it is well established that PPAR $\gamma$  promotes alternative activation of macrophages [28]. Our findings showing lack of effect of PPAR $\gamma$  deletion on M2 markers supports the concept that alternative M2 activation of Kupffer cells is controlled by PPAR $\delta$  [24]. Finally, the fact that hepatic lipid peroxidation increased in Alb-Cre mice is intriguing and suggests that PPAR $\gamma$  would act as one of the first responders to oxidative stress in hepatocytes. Consistent with this finding, previous studies have reported that PPAR $\gamma$  protects cells against oxidative stress by inducing mitochondrial

stabilization and promoting the expression of manganese SOD [29,30]. Moreover, the observation that PPAR $\gamma$  deletion in hepatocytes upon acute CCl<sub>4</sub> or LPS treatment resulted in reduced transaminase levels is also intriguing because this was not paralleled by a reduction in the inflammatory status. Considering that the main role of PPAR $\gamma$  in hepatocytes is the regulation of intracellular lipid stores [11], it can be speculated that this effect is driven by the existence of compensatory mechanisms in Kupffer cells bearing an intact anti-inflammatory PPAR $\gamma$  pathway. Also, the fact that ALT levels were not statistically significant different in the different mouse strains suggests that the degree of inflammatory damage in these mice is rather the consequence of mitochondrial injury than the level of hepatocyte death.

In summary, with the use of mice with liver cell type-specific deficiency of PPAR $\gamma$ , the current study provides evidence of the antiinflammatory and antifibrogenic roles of PPAR $\gamma$  in non-parenchymal liver cells. These results together with our previous findings showing a pro-steatotic role for this nuclear receptor in parenchymal liver cells (i.e. hepatocytes) [11], may shed some light on the limited therapeutic efficacy of PPAR $\gamma$  ligands, depending on the type of injury, duration of the disease and/or the severity of fibrosis at the time of the initiation of treatment.



**ACKNOWLEDGEMENTS**

We are indebted to the IDIBAPS Cytomics Unit for technical help.

**REFERENCES**

- [1] Bensinger SJ, Tontonoz P. Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors. *Nature* 2008;454:470-477.
- [2] Daynes RA, Jones DC. Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 2002;2:748-759.
- [3] Marra F, Efsen E, Romanelli RG, Caligiuri A, Pastacaldi S, Batignani G, Bonacchi A, et al. Ligands of PPARgamma modulate profibrogenic and proinflammatory actions in hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2000;119:466-478.
- [4] Miyahara T, Schrum L, Rippe R, Xiong S, Yee HF Jr, Motomura K, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors and hepatic stellate cell activation. *J Biol Chem* 2000;275:35715-35722.
- [5] Yu J, Zhang S, Chu ES, Go MY, Lau RH, Zhao J, et al. PPARgamma reverses hepatic nutritional fibrosis in mice and suppresses activation of hepatic stellate cells in vitro. *Int J Biochem Cell Biol* 2010;42:948-957.
- [6] Yang MD, Chiang YM, Higashiyama R, Asahina K, Mann DA, Mann J, et al. Rosmarinic acid and baicalin epigenetically derepress peroxisomal proliferator-activated receptor  $\gamma$  in hepatic stellate cells for their antifibrotic effect. *Hepatology* 2012;55:1271-1281.
- [7] Galli A, Crabb DW, Ceni E, Salzano R, Mello T, Svegliati-Baroni G, et al. Antidiabetic thiazolidinediones inhibit collagen synthesis and hepatic stellate cell activation in vivo and in vitro. *Gastroenterology* 2002;122:1924-1940.
- [8] Leclercq IA, Sempoux C, Stärkel P, Horsmans Y. Limited therapeutic efficacy of pioglitazone on progression of hepatic fibrosis in rats. *Gut* 2006;55:1020-1029.
- [9] Li L, Tao J, Davaille J, Feral C, Mallat A, Rieusset J, et al. 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 12;276:38152-38158.
- [10] Chawla A, Barak Y, Nagy L, Liao D, Tontonoz P and Evans RM. PPAR-gamma dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. *Nat Med* 2001;7:48-52.

- [11] Morán-Salvador E, López-Parra M, García-Alonso V, Titos E, Martínez-Clemente M, González-Pérez A, et al. Role for PPAR $\gamma$  in obesity-induced hepatic steatosis as determined by hepatocyte- and macrophage-specific conditional knockouts. *FASEB J* 2011;25:2538-2550.
- [12] Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, et al. PPARgamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell* 1999;4:585-595.
- [13] He W, Barak Y, Hevener A, Olson P, Liao D, Le J, Nelson M, et al. Adipose-specific PPARgamma knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:15712-15717.
- [14] Postic C, Shiota M, Niswender KD, Jetton TL, Chen Y, Moates JM, et al. Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic beta cell-specific gene knock-outs using Cre recombinase. *J Biol Chem* 1999;274:305–315.
- [15] Clausen BE, Burkhardt C, Reith W, Renkawitz R, Forster I. Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res* 1999;8:265-277.
- [16] Titos E, Rius B, González-Pérez A, López-Vicario C, Morán-Salvador E, Martínez-Clemente M, et al. Resolvin D1 and its precursor docosahexaenoic acid promote resolution of adipose tissue inflammation by eliciting macrophage polarization toward an M2-like phenotype. *J Immunol* 2011;187:5408-5418.
- [17] Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115:209-218.
- [18] Hevener AL, Olefsky JM, Reichart D, Nguyen MT, Bandyopadhyay G, Leung HY, et al. Macrophage PPARgamma is required for normal skeletal muscle and hepatic insulin sensitivity and full antidiabetic effects of thiazolidinediones. *J Clin Invest* 2007;117:1658-1669.
- [19] Wu L, Yan C, Czader M, Foreman O, Blum JS, Kapur R, et al. Inhibition of PPAR $\gamma$  in myeloid-lineage cells induces systemic inflammation, immunosuppression, and tumorigenesis. *Blood* 2012;119:115-126.
- [20] Kinoshita K, Iimuro Y, Fujimoto J, Inagaki Y, Namikawa K, Kiyama H, et al. Targeted and regulable expression of transgenes in hepatic stellate cells and myofibroblasts in culture and in vivo using an adenoviral Cre/loxP system to antagonise hepatic fibrosis. *Gut* 2007;56:396-404.

- [21] Kisseleva T, Cong M, Paik Y, Scholten D, Jiang C, Benner C, et al. Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109:9448-9453.
- [22] Govoni KE, Wergedal JE, Florin L, Angel P, Baylink DJ and Mohan S. Conditional deletion of insulin-like growth factor-I in collagen type-1 alpha2-expressing cells results in postnatal lethality and a dramatic reduction in bone accretion. *Endocrinology* 2007;148:5706-5715.
- [23] Beaven SW, Wroblewski K, Wang J, Hong C, Bensinger S, Tsukamoto H, Tontonoz P. Liver X receptor signaling is a determinant of stellate cell activation and susceptibility to fibrotic liver disease. *Gastroenterology* 2011;140:1052-1062.
- [24] Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Red Eagle A, Vats D, Morel CR, Goforth MH, et al. Alternative M2 activation of Kupffer cells by PPARdelta ameliorates obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab* 2008;7:496-507.
- [25] Schadinger SE, Bucher NL, Schreiber BM and Farmer SR. PPARgamma2 regulates lipogenesis and lipid accumulation in steatotic hepatocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005;288:E1195-1205.
- [26] Sun B, Karin M. NF-kappaB signaling, liver disease and hepatoprotective agents. *Oncogene* 2008;20:6228-6244.
- [27] Pascual G, Fong AL, Ogawa S, Gamliel A, Li AC, Perissi V, et al. A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. *Nature* 2005;437:759-763.
- [28] Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Goforth MH, Morel CR, Subramanian V, Mukundan L, et al. Macrophage-specific PPAR $\gamma$  controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature* 2007; 447:1116–1120.
- [29] Fuenzalida K, Quintanilla R, Ramos P, Piderit D, Fuentealba RA, Martinez G, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma up-regulates the Bcl-2 anti-apoptotic protein in neurons and induces mitochondrial stabilization and protection against oxidative stress and apoptosis. *J Biol Chem* 2007;282:37006-37015.

[30] Ding G, Fu M, Qin Q, Lewis W, Kim HW, Fukai T, et al. Cardiac peroxisome proliferator-activated receptor gamma is essential in protecting cardiomyocytes from oxidative damage. *Cardiovasc Res.* 2007;76:269-279.

## FIGURE LEGENDS

**Fig.1. Effects of cell-targeted deletion of PPAR $\gamma$  on hepatic inflammation.** (A) Hepatic PPAR $\gamma$  protein expression in wild-type mice (n=12) subjected to 0, 4, 6 and 8 weeks of CCl<sub>4</sub> treatment. (B) Heterozygous floxed/null PPAR $\gamma$  deficient mice harbouring one loxP-targeted PPAR $\gamma$  allele (flanking exons 1 and 2) and a blunted PPAR $\gamma$  allele by the in-frame insertion of a LacZ-cassette (exon 2). (C) Cre recombinase constructs driven by albumin (Alb) or lysozyme M (LysM) promoters and PCR analysis of genomic liver DNA isolated from control (CT), Alb-Cre and LysM-Cre mice. Expression of PPAR $\gamma$  isoforms 1 ( $\gamma$ 1) and 2 ( $\gamma$ 2) in hepatocytes from CT (n=11) and Alb-Cre (n=6) mice and macrophages from CT (n=5) and LysM-Cre (n=6) mice was assessed by real-time PCR. (D) Liver sections stained with hematoxylin-eosin from CT (n=8), Alb-Cre (n=8) and LysM-Cre (n=9) mice subjected to 8-week CCl<sub>4</sub> injury (x200 and x400 (inset) magnifications) (Scale bars: 100 and 50  $\mu$ m, respectively). (E) Serum ALT and AST levels. (F) Expression of COX-2, TNF- $\alpha$ , CXCL2, IL-1 $\beta$ , IL-6 and MCP-1 after 8 weeks of CCl<sub>4</sub> treatment. Results are mean  $\pm$  SEM. \*, P<0.05 and \*\*, P<0.01, \*\*\*, P<0.001 versus CT mice or time 0.

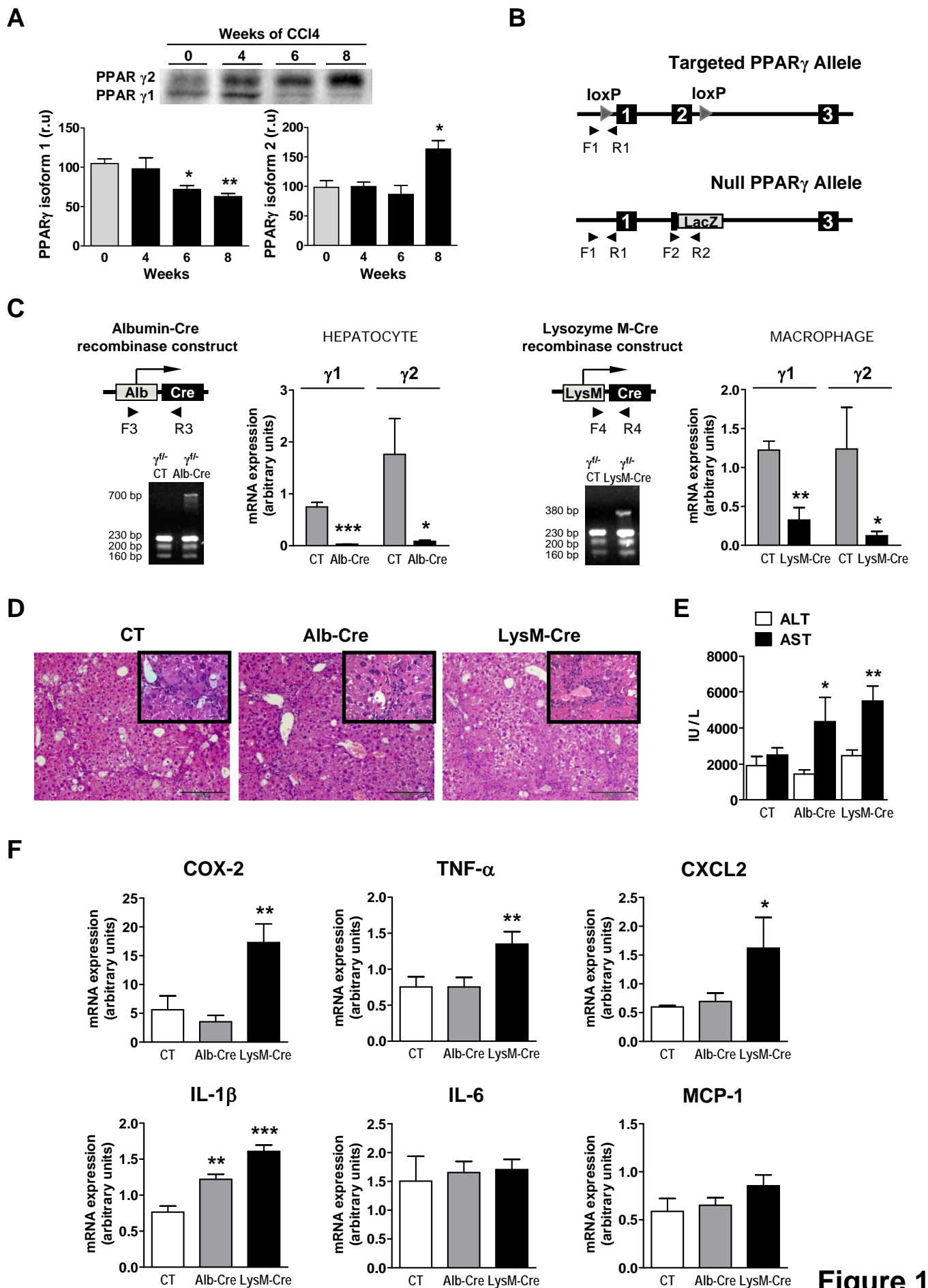
**Fig. 2. Absence of PPAR $\gamma$  in macrophages leads to increased inflammatory damage and fibrogenesis.** (A) 4-HNE protein adducts in liver samples from CT (n=8), Alb-Cre (n=8) and LysM-Cre (n=9) mice subjected to 8-week CCl<sub>4</sub> injury. (B) DNA binding activity of NF- $\kappa$ B in nuclear extracts. (C) Densitometric analysis of cleaved-caspase-3 protein signal and luminescence caspase 3/7 activity in liver samples of 8-week CCl<sub>4</sub>-treated mice. RLU, relative light units. (D) Liver sections stained with F4/80 antibody (x200 magnification, scale bar: 100  $\mu$ m) from 8-week CCl<sub>4</sub> treated mice. (E) Sirius Red (x40 magnification, scale bar: 500  $\mu$ m) and Masson's trichrome (x100 magnification, scale bar: 200  $\mu$ m) staining. (F) Hepatic hydroxyproline content. (G) Expression of  $\alpha$ -SMA, TIMP-1, MMP-2 and TGF- $\beta$  was assessed by real-time. Results are mean  $\pm$  SEM. \*, P<0.05 and \*\*, P<0.01, \*\*\*, P<0.001 versus CT mice.

**Fig. 3. PPAR $\gamma$  disruption in Kupffer cells worsens the response to LPS in high precision-cut liver slices (PCLS).** Expression of inflammatory (M1) markers (TNF- $\alpha$ , COX-2 and IL-6) (A) and ALT and LDH activities (B) in PCLS from wild-type mice incubated for 18 h with vehicle or LPS (100  $\mu$ g/ml). (C) IL-6, COX-2 and TNF- $\alpha$  expression in PCLS from control (CT) and LysM-Cre mice incubated with LPS. (D) ALT and LDH levels in culture medium from CT and LysM-Cre PCLS. (E) TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  expression in PCLS from CT and LysM-Cre mice incubated with LPS in the absence or presence of rosiglitazone (Rosi, 10  $\mu$ M). (F) Expression of alternative (M2) macrophage activation markers (IL-4, IL-10 and Arg1) in PCLS from CT and LysM-Cre mice incubated with LPS. Results are fold change respect to vehicle and represent mean  $\pm$  SEM from 3 independent experiments performed in triplicate. \*, P<0.05, \*\*, P<0.01 and \*\*\*, P<0.001 versus Veh or CT mice with LPS alone; a, P<0.05 and b, P<0.001 versus CT mice with LPS and Rosi.

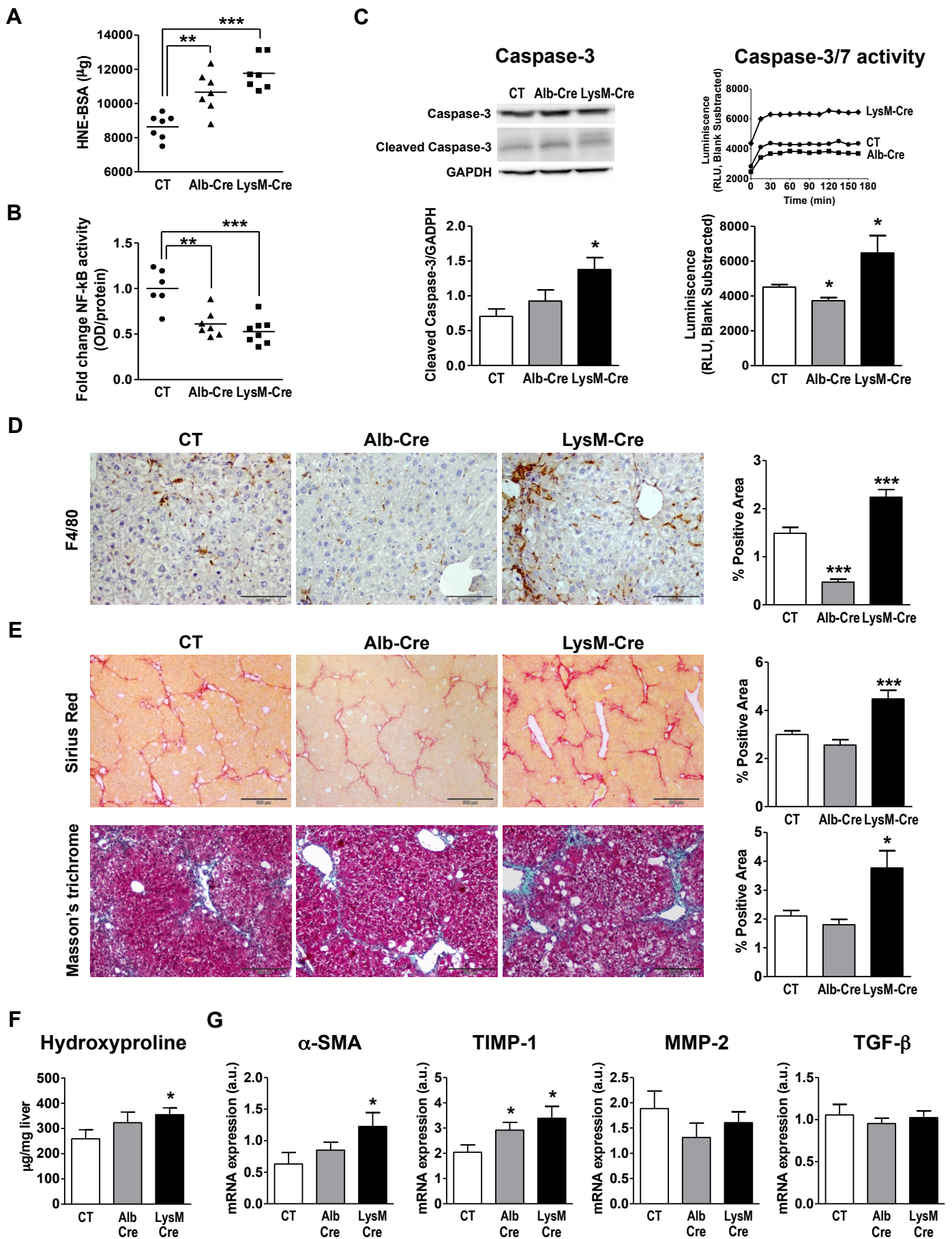
**Fig. 4. PPAR $\gamma$  deletion in hepatic stellate cells (HSCs) intensifies hepatic damage and CCl $_4$ -induced fibrosis progression.** (A) Cre recombinase construct driven by aP2 promoter and PCR genotyping of CT (230, 200 and 160 bp) or aP2-Cre (600, 230, 200 and 160 bp) mice. (B) *Left panel*, Representative FACS plot identifying vitamin A auto-fluorescent HSCs. Vitamin A positive events are in purple. *Right panel*, Representative dot plot from vitamin A negative gated cells evaluating CD11b and F4/80 expression. Double-positive CD11b/F4/80 events are in blue and identify Kupffer cells (KC). (C) aP2 and PPAR $\gamma$  mRNA expression in primary cultures of quiescent HSCs, hepatocytes (Hep) and KC. (D) Changes in aP2 and PPAR $\gamma$  expression during the HSC transactivation process. (E) Immunocytochemical analysis of PPAR $\gamma$  in quiescent HSCs (qHSC), activated HSCs (aHSC) and KC from CT (n=4) and aP2-Cre (n=4) mice (x400 magnification). (F) Serum ALT and AST activities in CT (n=8) and aP2-Cre (n=7) mice after 8-week CCl $_4$  challenge. (G) Hepatic hydroxyproline content normalized to liver weight in CCl $_4$  challenged mice. (H) Liver sections stained with Sirius Red (x40 magnification, scale bar: 500  $\mu$ m) and Masson's trichrome (x100 magnification, scale bar: 200  $\mu$ m) from 8-week CCl $_4$ -treated mice. (I) Expression of  $\alpha$ -SMA and TIMP-1 in 8-week CCl $_4$ -treated mice

was assessed by real-time PCR. Results are mean  $\pm$  SEM. \*,  $P < 0.05$  and \*\*,  $P < 0.001$  versus qHSCs. a,  $P < 0.05$  and b,  $P < 0.01$  versus CT.

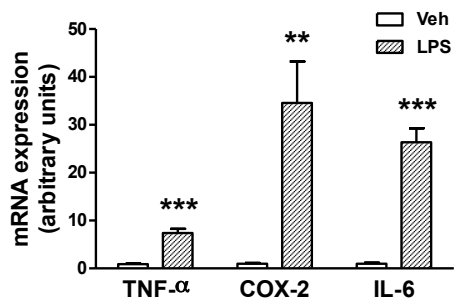
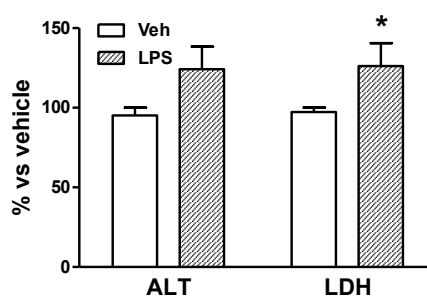
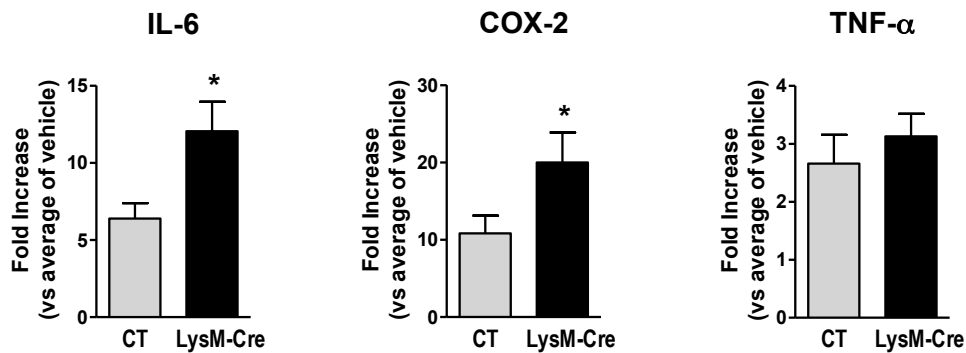
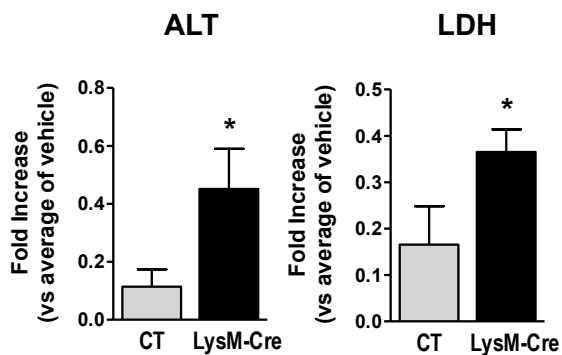
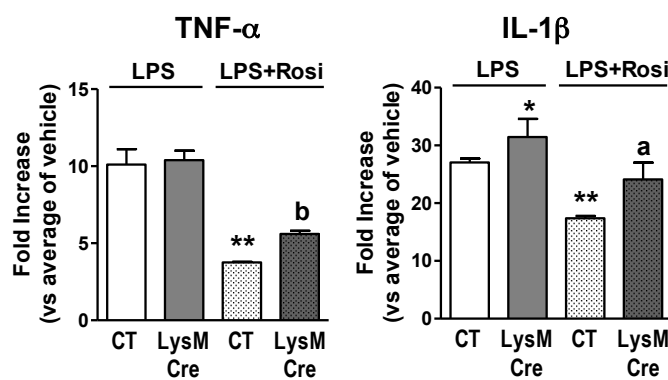
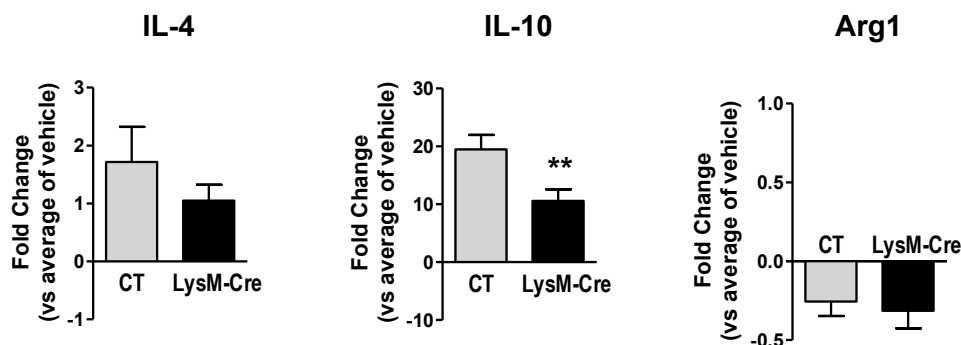


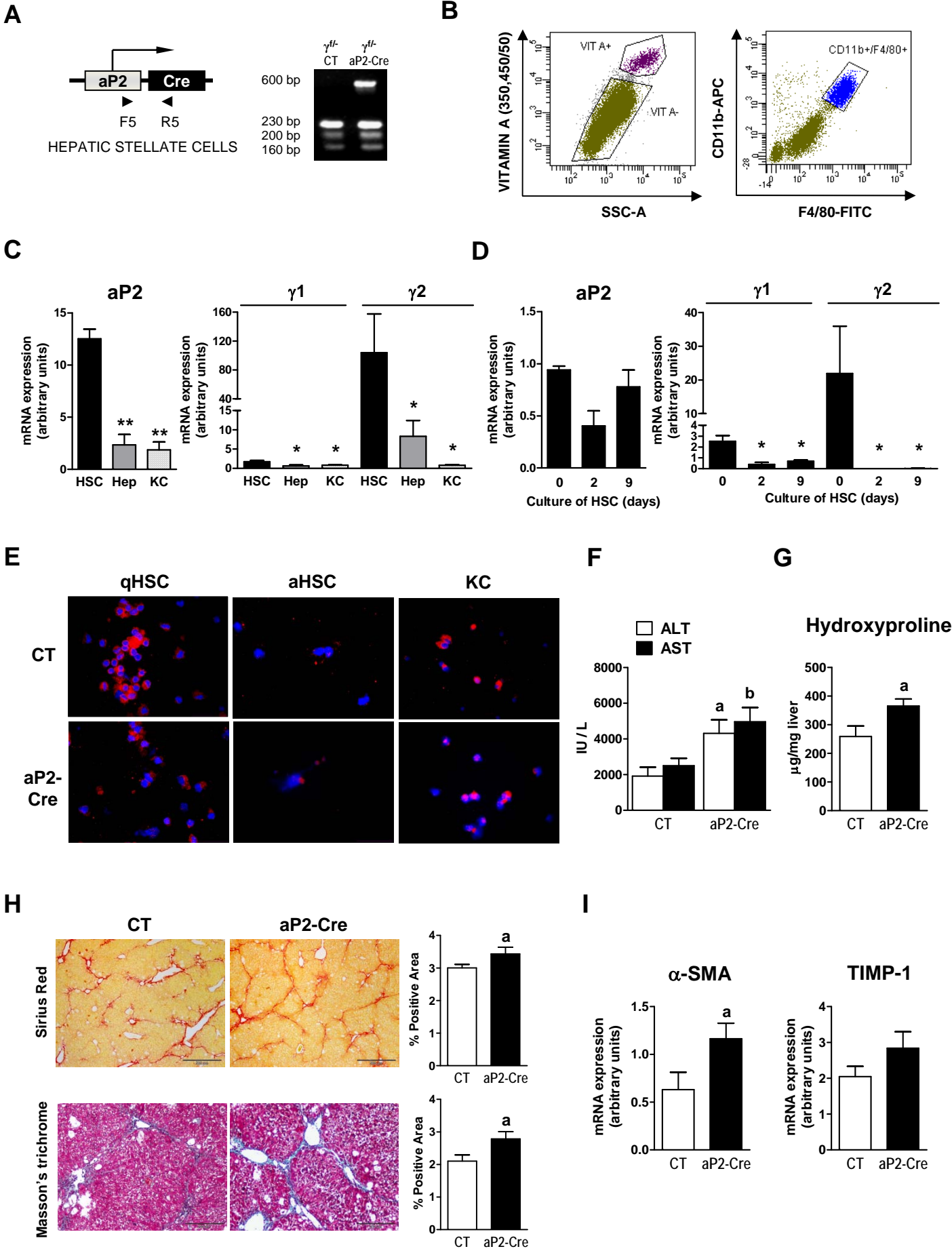


**Figure 1**



**Figure 2**

**A****B****C****D****E****F****Figure 3**



**Figure 4**

## SUPPLEMENTARY MATERIAL AND METHODS

***Mice breeding and DNA genotyping:*** The mouse colonies were maintained by crossing mice homozygous for the loxP-targeted PPAR $\gamma$  gene (flanking exons 1 and 2) with heterozygous mice carrying a loxP-targeted PPAR $\gamma$  allele and a null allele in exon 2. The mice were housed in wood-chip bedding cages with a humidity level of 50-60% and a 12-hour light-dark cycle. Genomic DNA from mouse ears was isolated using the Omni-Pure<sup>TM</sup> Tissue Genomic DNA Purification System (Gene Link, NY) following the manufacturer's protocol with slight modifications. Mice were genotyped by a multiplex PCR, which was performed in a total of 20  $\mu$ l containing 1  $\mu$ l of DNA, 2  $\mu$ l 10x reaction buffer (2.5 mM MgCl<sub>2</sub>), 3.2  $\mu$ l 1.25 mM dNTPs, 1  $\mu$ l of primers (see **Supplementary Table 1**), and 0.1  $\mu$ l 5 PRIME HotMaster Taq DNA Polymerase (0.5 U) (5 PRIME GmbH, Hamburg, Germany). The F1 and R1 primer pair recognizes LoxP sites on either side of exons 1 and 2 of PPAR $\gamma$  according to the nomenclature originally described by Zhu et al [1]<sup>a</sup>, common for both PPAR $\gamma$  isoforms. The F2 primer specifically binds to 3' part of intron 4 common to both PPAR $\gamma$  1 and 2 [2]. PCR samples were amplified at 94°C (20 seconds), 60°C (45 seconds) and 71.5°C (1 minute and 30 seconds) for 40 cycles. PCR products were analyzed by electrophoresis in 2.5% LM Sieve agarose gels (Laboratorios Conda, Madrid, Spain) and visualized by GelRed<sup>TM</sup> Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Hayward, CA), using a 100-bp DNA ladder marker (Invitrogen, Carlsbad, CA).

***Acute and chronic models of liver injury:*** The animals used in the study were F3 or subsequent generations of age-matched littermates. Acute liver injury was induced by CCl<sub>4</sub> (0.5 ml/kg b.w., i.p., 1:15 (v/v) in olive oil) and the mice were sacrificed after 24 hours. Chronic liver injury was induced by CCl<sub>4</sub> (1 ml/kg b.w., i.p., 1:7 (v/v) in olive oil, twice a week) for 8 weeks starting at the 8<sup>th</sup> week of age. The time-course response was assessed in a group of wild-type mice (n=12) exposed to CCl<sub>4</sub> for 4, 6 and 8 weeks. At the end of the study, mice were euthanized under ketamine/xylazine (4:1, i.p.) anesthesia, blood was collected and serum obtained by centrifugation

at 3,000 g for 10 minutes. Livers were excised, rinsed in DPBS and fixed in 10% formalin. In addition, portions of liver tissues were embedded in OCT or snap-frozen in N<sub>2</sub> for further analysis.

**Glucose tolerance tests:** To perform the glucose tolerance test (GTT), mice were fasted for six hours before receiving an i.p. injection of 20% glucose (2 g/Kg b.w.) (Sigma, St Louis, MO) and blood samples were collected from the tail 0, 5, 15, 22.5, 30, 45, 60 and 90 minutes later for serum glucose determination using the Accu-Chek Aviva system (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland).

**Histological analysis:** Liver tissue samples fixed in 10% formalin were embedded in paraffin, cut into 5 µm sections, stained with H&E and analyzed by a registered pathologist (R.M.) unaware of the treatments. The degree of hepatocellular damage was determined by assessing necroinflammatory injury at a magnification of 200X. Hepatic steatosis was assessed by Oil Red-O staining in OCT embedded samples. Briefly, cryosections were fixed in 60% isopropanol for 10 minutes and stained with 0.3% Oil Red-O in 60% isopropanol for 30 minutes and subsequently washed with 60% isopropanol. Sections were counterstained with Gill's hematoxylin, washed with acetic acid solution (4%) and mounted with aqueous solution. Liver fibrosis was assessed in paraffin sections by Sirius Red and Masson's trichrome staining. Briefly, liver sections were incubated for 10 minutes in 0.5% thiosemicarbazide and stained in 0.1% Sirius Red F3B in saturated picric acid for 1 hour, and subsequently washed with an acetic acid solution (0.5%). Masson's trichrome staining was performed at the Pathology Department of the Hospital Clínic. Sections were visualized under a Nikon Eclipse E600 microscope (Kawasaki, Kanagawa, Japan) and the relative areas of steatosis and fibrosis were quantitated by histomorphometry using Olympus Cell (Olympus Soft Imaging Solution GmbH, Münster, Germany) and Image J software (Macbiophotonics, McMaster University, Hamilton, ON, Canada), respectively. A minimum of 6-20 independent fields was evaluated.

**Hepatic hydroxyproline content:** Liver samples (50 mg) were homogenized in 6N HCl and hydrolyzed at 120°C overnight. The lysate was centrifuged at 12,000 g for 10 min at 4°C and

supernatant was evaporated to dryness under vacuum. Hepatic hydroxyproline content was determined using the Hydroxyproline Colorimetric Assay kit (BioVision, San Francisco, CA). Data were normalized to liver weight.

**Detection of F4/80 by immunohistochemistry:** Liver paraffin sections were deparaffinized, rehydrated and pre-treated with 0.05% trypsin/0.1% CaCl<sub>2</sub> for 20 minutes at 37°C to unmask the antigen. Subsequently, sections were incubated with Peroxidase-Blocking Solution (Dako, Glostrup, Denmark) for 25 minutes at room temperature and dark conditions to block endogenous peroxidase activity and with BSA 2% for 20 minutes at room temperature to avoid unspecific binding of the primary antibody. Sections were then incubated overnight at 4°C with the primary rat anti-mouse F4/80 antibody (1/400) (Serotec, Oxford, UK) followed by incubation for 30 minutes at room temperature with a biotinylated rabbit anti-rat IgG secondary antibody (1/200) and incubation with ABC for 30 minutes at room temperature using the Vectastain® ABC kit (Vector, Burlingame, CA). Color was developed using the diaminobenzidine substrate (Roche Diagnostics) and sections were counterstained with hematoxylin. Sections were visualized at a magnification of x200 and F4/80-positive staining was quantitated by histomorphometry using Olympus Cell. A minimum of 15 fields per sample was quantified and results were expressed as % of positive area.

**Isolation and culture of liver cells:** Hepatocytes from wild-type (n=3), CT (n=6) and Alb-Cre (n=7) mice were isolated by a three-step *in situ* perfusion procedure using 0.04% collagenase IV (Sigma, St Louis, MO) through the portal vein. Hepatocytes were plated on collagen I-coated plates and cultured in Williams' E medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 50 IU/mL of penicillin, 50 µg/mL streptomycin, 1 µM insulin, 15 mM HEPES and 50 µM β-mercaptoethanol [3]. Primary hepatocytes were characterized by a combination of phase-contrast microscopy, immunocytochemical analysis (cytokeratin 8-positive) and periodic acid-Schiff reaction and their viability was determined by trypan blue exclusion. Hepatocytes were cultured in 12-well plates at a density of 400,000 cells/well, incubated for 18 hours with either vehicle (Veh, EtOH<0.04%) or oleic acid (OA, 200 µM), plus 25 mM of D-Glucose and 1.5% FFA-free BSA in

1% FBS supplemented William's E Medium and maintained in a humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C.

For flow cytometry cell sorting, Kupffer cells and HSCs were purified from livers perfused *in situ* through the inferior cava vein with HBSS<sup>-/-</sup> containing 0.04% collagenase IV (Sigma) without pronase, which is known to affect macrophage receptors [4]. Thereafter, perfused livers were cut, disgregated and digested in 0.01% collagenase IV-0.001% DNase I solution (Roche Diagnostics) and shaken for 5 min at 37°C. The resulting cell suspension was filtered, centrifuged at 70 g for 2 min to pellet the remaining hepatocytes, and then centrifuged at 600 g for 10 min at 4°C. The pellet of non-parenchymal cells was resuspended in Gey's Balanced Salt Solution and purified by density gradient centrifugation using 16% Nycodenz (Sigma). Cell viability was checked by trypan blue exclusion. The resulting pellet of Kupffer cells and HSCs was resuspended in a basic sorting buffer (DPBS<sup>-/-</sup> containing 1 mM EDTA, 25 mM HEPES, pH 7, and 1% FBS), then counted and prepared for flow cytometry. Briefly, Kupffer cells and HSCs were incubated at 4°C with Mouse D Fc Block (2.5 µg/ml) prior to staining with fluorescently labeled primary CD11b–allophycocyanin (0.625 µg/ml) and F4/80–FITC (0.125 µg/ml) or isotype control IgGs for 50 min at 4°C in the dark. Cells were suspended in a basic sorting buffer and sorted in a FACSAriaSORP cytometer with FACSDiva v6.1.3 software (BD Biosciences, San Jose, CA). Propidium iodide was used to exclude dead cells. Unstained, single stains, and fluorescence minus one controls were used for setting compensation and gates. HSCs were identified at the UV channel and collected as vitamin A auto-fluorescent positive cells based on their emission at 450 nm, whereas Kupffer cells were identified from vitamin A negative gated cells as double-positive (CD11b<sup>+</sup>/F4/80<sup>+</sup>) cells. Kupffer cells were collected in TRIzol reagent (Invitrogen). HSCs were collected in TRIzol reagent at day 0, 2 and 9 days of culture in supplemented DMEM containing 10% FBS and antibiotics.

For immunocytochemical analysis, Kupffer cells and HSCs were isolated by perfusion of with 0.04% collagenase A solution (Roche Diagnostics) and digestion by shaking in 0.04% collagenase A-0.05% Pronase-0.01% DNase I solution (Roche Diagnostics) for 10 min at 37°C as described in



reference [5] with modifications. Cells were filtered through a 100 µm cell strainer and hepatocytes were discarded after centrifugation. For HSC enrichment, non-parenchymal cells were resuspended in 14% Nycodenz density gradient, collected from the diffuse top layer and centrifuged at 500 g for 5 min at 4°C. HSCs were cultured for 9 days on 8-chamber Polystyrene Vessel Tissue Culture Slides (BD Biosciences) in DMEM supplemented with 4 mM L-glutamine, 2.2 mM sodium pyruvate, 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 50 µg/ml gentamicin and 10% FBS in a humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C. Medium was changed every 24 h thereafter. Kupffer cells were enriched by attachment for 1 hour in Nunc Lab-Tek Chamber Slide system 8 wells Permanox Slide (Thermo Scientific, Waltham, MA). Nonadherent cells were removed by two washes with DPBS<sup>+/+</sup> and Kupffer cells were cultured for 1 day in RPMI supplemented with 10% FBS.

***Isolation and culture of peritoneal macrophages and adipocytes:*** Resident peritoneal macrophages from naïve wild-type mice (n=3), CT (n=5) and LysM-Cre (n=6) mice were collected by peritoneal lavage with 7 ml ice-cold DPBS<sup>-/-</sup>. The exudates were centrifuged at 500 g for 5 min and further resuspended in DMEM supplemented with penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml), L-glutamine (2 mM), and 5% FBS. Cells were allowed to adhere to P-60 Petri dishes over 2 h at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator. Nonadherent cells were removed by washing twice with DPBS<sup>-/-</sup>. Adipocytes from wild-type mice (n=3) were isolated from epididymal fat pads and digested in buffer containing Krebs–Ringer supplemented with 1% FAF-BSA and 1 mg/ml collagenase A (Roche Diagnostics) as previously described.

***PCLS:*** Liver blocks of approximately 0.5 cm<sup>3</sup> were cut from the main lobule with a scalpel and embedded in 4% UltraPure<sup>™</sup> Low Melting Agarose (Invitrogen) diluted in HBSS<sup>-/-</sup>. An agarose cube with the tissue inside was sliced into 250 µm-thick slices in an ice-cold HBSS<sup>-/-</sup> bath using a Leica VT1000S vibrating blade microtome (Wetzlar, Germany). Selected PCLS were individually transferred into P-35 Petri dishes containing the Millicell<sup>®</sup> Cell Culture Inserts (Millipore, Billerica,

MA) pre-balanced for 20 min with pre-warmed William's E Medium containing GlutaMAX™-I (Invitrogen) supplemented with 25 mM D-Glucose and 50 µg/ml gentamicin.

***Analysis of gene expression:*** Total RNA from liver tissue and cells was obtained using the TRIzol reagent (Invitrogen). RNA from PCLS was obtained by RNeasy® Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). RNA concentration was assessed in a Nanodrop (Wilmington, DE) and its integrity was tested with a RNA 6000 Nano Assay in a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Samples were retrotranscribed with the high-capacity cDNA archive kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Quantitative analysis of gene expression was performed by real-time PCR in an ABI Prism 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Validated and pre-designed TaqMan primers and probes from Assays-on-Demand were used to quantify  $\alpha$ -SMA (Mm01546133\_m1), aP2 (Mm00445878\_m1), CXCL2 (Mm00436450\_m1), COX-2 (Mm00478374\_m1), IL-1 $\beta$  (Mm01336189\_m1), IL-6 (Mm00446190\_m1), MMP-2 (Mm00439506\_m1), MCP-1 (Mm00441242\_m1), PPAR $\gamma$  (Mm00440945\_m1), PPAR $\gamma$ 2 (ID: Mm00440940\_m1), TIMP-1 (Mm00441818\_m1), TGF $\beta$  (Mm00441724\_m1) and TNF- $\alpha$  (Mm00443258\_m1), using  $\beta$ -actin (Mm00607939\_s1) as an endogenous control. PCR results were analyzed with Sequence Detector Software (version 2.1; Applied Biosystems). Custom primers and probe set for PPAR $\gamma$ 1 (ID: AIQJA0P) was designed by using Primer Express® Software for Real-Time PCR (version 3.0; Applied Biosystems). The amount of target gene, normalized to  $\beta$ -actin and relative to a calibrator, was determined by the arithmetic formula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  described in the Comparative Ct Method.

***Immunocytochemistry of PPAR $\gamma$  in primary liver cells:*** Quiescent HSCs (75.000 cells) in DMEM plus 10% FBS were immobilized to a single-well slide using a Cytospin 4 cytocentrifuge at 500 g for 5 min (Thermo Scientific). To activate HSCs, cells were seeded into 8-well chamber slides and cultured for 9 days. Kupffer cells were enriched by attachment for 1 hour as described. After washing with PBS, cells were fixed and permeabilized in ice-cold methanol:acetone (1:1) for 10

min at -20°C and then blocked with 5% goat serum in PBS for 1 h at room temperature. Cells were incubated overnight at 4°C with a primary rabbit anti-mouse PPAR $\gamma$  antibody raised against a recombinant protein corresponding to amino acids 6 to 105 (H-100) (dilution 1:100) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). After three washes, antibody binding was detected by incubation with CY3 goat anti-rabbit IgG (H+L) secondary antibody (dilution 1:100) (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA) for 1 h at room temperature. Cell nuclei were visualised after mounting with Vectashield with DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Images were collected with an Olympus BX51 microscope at x400 magnification.

***Analysis of PPAR $\gamma$  protein expression by Western blot:*** Mouse liver tissue was homogenized in 1 ml of 10 mM HEPES, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 0.3 mM sucrose, 0.1 mM EGTA, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM sodium fluoride, 0.1% Igepal and protease inhibitors at pH 7.9. The cell lysate was filtered through a nylon gauze and the nucleus was pelleted by centrifugation at 3,000 rpm for 20 minutes at 4°C. Thereafter, the pellet was washed twice and resuspended in 20 mM HEPES, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 420 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 25% glycerol, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 1 mM sodium orthovanadate, 0.5 mM spermidine and protease inhibitors at pH 7.9. After frequent vortexing for 15 min, nuclear homogenates were placed in a lab roller for 1 hour at 4°C. A total of 40  $\mu$ g of nuclear proteins from liver tissue were determined by Bradford protein assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) and resuspended in SDS-containing Laemmli sample buffer, heated for 5 minutes at 95°C and resolved in a 10% SDS-PAGE (from 40% acrylamide/bis, Bio-Rad Laboratories). Proteins were electroblotted for 120 min at 400 mA at 4°C onto PVDF membranes and the efficiency of the transfer was visualized by Ponceau S staining. Membranes were blocked for 1 h at room temperature in TBS (20 mM Tris-HCl pH 7.4 and 0.5 M NaCl) containing 0.1% (v/v) Tween 20 (0.1% T-TBS) and 3% (w/v) BSA. Blots were washed three times and subsequently treated overnight at 4°C with primary rabbit anti-mouse PPAR $\gamma$  antibody (dilution 1:200) (Santa Cruz Biotechnology) in 0.1% T-TBS containing 0.6% BSA. After washing, blots were incubated with

horseradish-peroxidase-linked donkey anti-rabbit antibody (dilution 1:5000) for 1 h at room temperature with in 0.1% T-TBS containing 0.6% BSA. Bands were visualized by enhanced chemiluminescence ECL Detection System (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK).

***Analysis of cleaved-caspase-3 by Western Blot:*** Total liver protein was extracted using a modified RIPA buffer containing 50 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, 1% Igepal, 1 mM EDTA, phosphatase and protease inhibitors (PhosSTOP and Complete Mini Inhibitor Cocktail Tablets, Roche). Homogenates were incubated on ice for 15 min with frequent vortexing and centrifuged at 16,100 g for 20 min at 4°C and protein samples were measured using the MicroBCA™ Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL). Fifty µg of total protein from the supernatants were placed in SDS-containing Laemmli sample buffer, heated for 5 min at 95°C and separated by 15% SDS-PAGE. After transfer, blocking and washing, membranes were incubated overnight at 4°C with primary rabbit anti-mouse cleaved caspase-3 antibody (dilution 1:500) (Cell Signaling, Danvers, MA). Thereafter, blots were incubated for 1 h at room temperature with a horseradish-peroxidase-linked donkey anti-rabbit antibody (dilution 1:2000) and bands were visualized using the EZ-ECL chemiluminescence Detection Kit (Biological Industries, Haemek, Israel). To assess procaspase-3 and the housekeeping GAPDH, membranes were stripped twice at room temperature for 15 min in Restore™ Western Blot Stripping Buffer (Thermo Scientific) and reprobod with primary rabbit anti-mouse caspase-3 antibody (dilution 1:1000) (Cell Signaling) and GAPDH (dilution 1:1000) (Abcam, Cambridge, UK). Blots were visualized as described above.

***NF-κB activity:*** NF-κB activity was assessed in nuclear extracts from samples of liver tissue prepared using the Nuclear Extraction kit from Millipore, following the manufacturer's protocol with slight modifications. Briefly, 40 mg of tissue were homogenized in 1 ml ice-cold cytoplasmic lysis Buffer and the suspension obtained was filtered through a 250-µm nylon mesh and centrifuged for 5 min at 250 g at 4°C. Samples were incubated on ice for 15 min and washed twice, then centrifuged for 20 min at 8,000 g at 4°C. The remaining pellet was resuspended in a Dounce homogenizer in ice-cold cytoplasmic lysis buffer and lysed using a small-gauge needle (26G).

Thereafter, lysates were placed on an orbital shaker for 1 h at 4°C and centrifuged at 16,000 g for 20 min at 4°C to obtain the nuclei. Nuclear extract proteins were quantified with the MicroBCA™ Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL). NF-κB activity was determined using the NF-κB (p65) Transcription Factor Assay Kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI). A total amount of 10 µl of nuclear extract was assayed in duplicate and DNA binding activity of the NF-κB p65 subunit was normalized to each nuclear protein concentration.

***4-hydroxynonenal (4-HNE) detection:*** Lipid peroxidation was determined by measuring the 4-HNE bi-products which are capable of binding to proteins and forming stable adducts. Total liver protein was extracted using Premixed PBS Buffer (Roche) containing proteinase inhibitors (Complete Mini Inhibitor Cocktail Tablets) and 0.005% butylated hydroxytoluene (Sigma). Homogenates were measured using the MicroBCA™ Protein Assay Kit (Pierce) and 4-HNE was determined using the OxiSelect™ HNE Adduct ELISA kit (Cell Biolabs, San Diego, CA).

<sup>a</sup> *According to the current NCBI and ENSEMBL nomenclature these are exons 4 and 5.*

## REFERENCES

- [1] Zhu Y, Qi C, Korenberg JR, Chen XN, Noya D, Rao MS, et.al. Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms. Proc Natl Acad Sci USA 1995;92:7921-7925.
- [2] Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, et al. PPARgamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. Mol Cell 1999;4:585-595.
- [3] Martínez-Clemente M, Ferré N, González-Pérez A, López-Parra M, Horrillo R, Titos E, et al. 5-lipoxygenase deficiency reduces hepatic inflammation and TNFalpha-induced hepatocyte damage in hyperlipidemia-prone ApoE-null mice. Hepatology 2010;51:817-827.

[4] Ikejima K, Enomoto N, Seabra V, Ikejima A, Brenner DA, Thurman RG. Pronase destroys the lipopolysaccharide receptor CD14 on Kupffer cells. *Am J Physiol* 1999;276:G591-598.

[5] Bataller R, Schwabe RF, Choi YH, Yang L, Paik YH, Lindquist J, et al. NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis. *J Clin Invest* 2003;112:1383-1394.

## SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

**Supplementary Fig. 1:** *Liver damage in the chronic CCl<sub>4</sub> model of liver injury.* (A) Representative photomicrographs of liver sections stained with Oil Red-O (x200 magnification, scale bar: 100 μm), hematoxylin-eosin (x200 magnification, scale bar: 100 μm) and Sirius Red (x40 magnification, scale bar: 500 μm) from wild-type mice receiving either olive oil (Oil) (n=7) or CCl<sub>4</sub> (n=8) for 8-weeks. (B) Serum ALT and AST after oil or CCl<sub>4</sub> treatment. (C) Ponceau stained membrane used as protein loading control of the representative blot shown in Figure 1A. (D) PPAR $\gamma$  mRNA expression in wild-type hepatocytes incubated with either vehicle or oleic acid (OA). Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*, P<0.001 versus Oil.

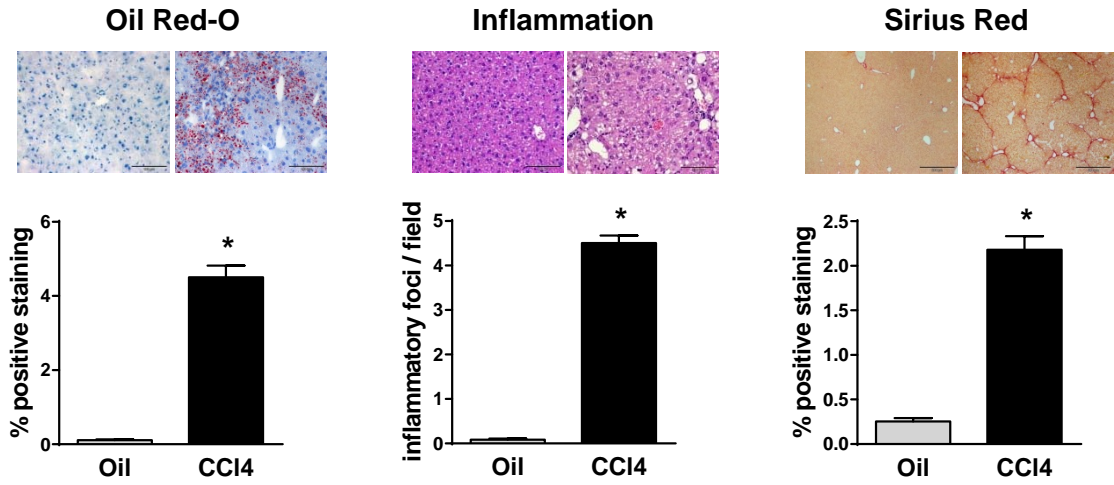
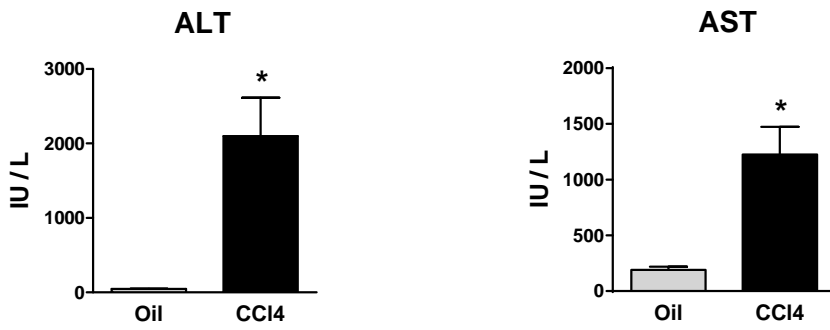
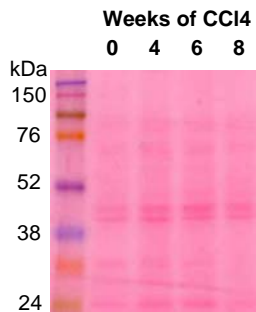
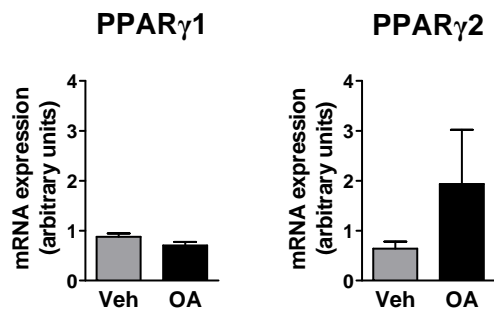
**Supplementary Fig. 2:** *Macrophage PPAR $\gamma$  deletion leads to hepatic damage upon acute CCl<sub>4</sub> liver injury.* Serum ALT and AST levels and hepatic expression of proinflammatory genes (COX-2, TNF- $\alpha$ , IL-6 and MCP-1) were assessed in control (CT) (n=12) and LysM-Cre (n=8) mice receiving either oil (-CCl<sub>4</sub>) or CCl<sub>4</sub> (+CCl<sub>4</sub>) for 24 h. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*, P<0.01 and \*\*, P<0.001 versus untreated CT mice; #, P<0.05 versus CCl<sub>4</sub>-treated CT mice; a, P<0.05 versus untreated LysM-Cre mice.

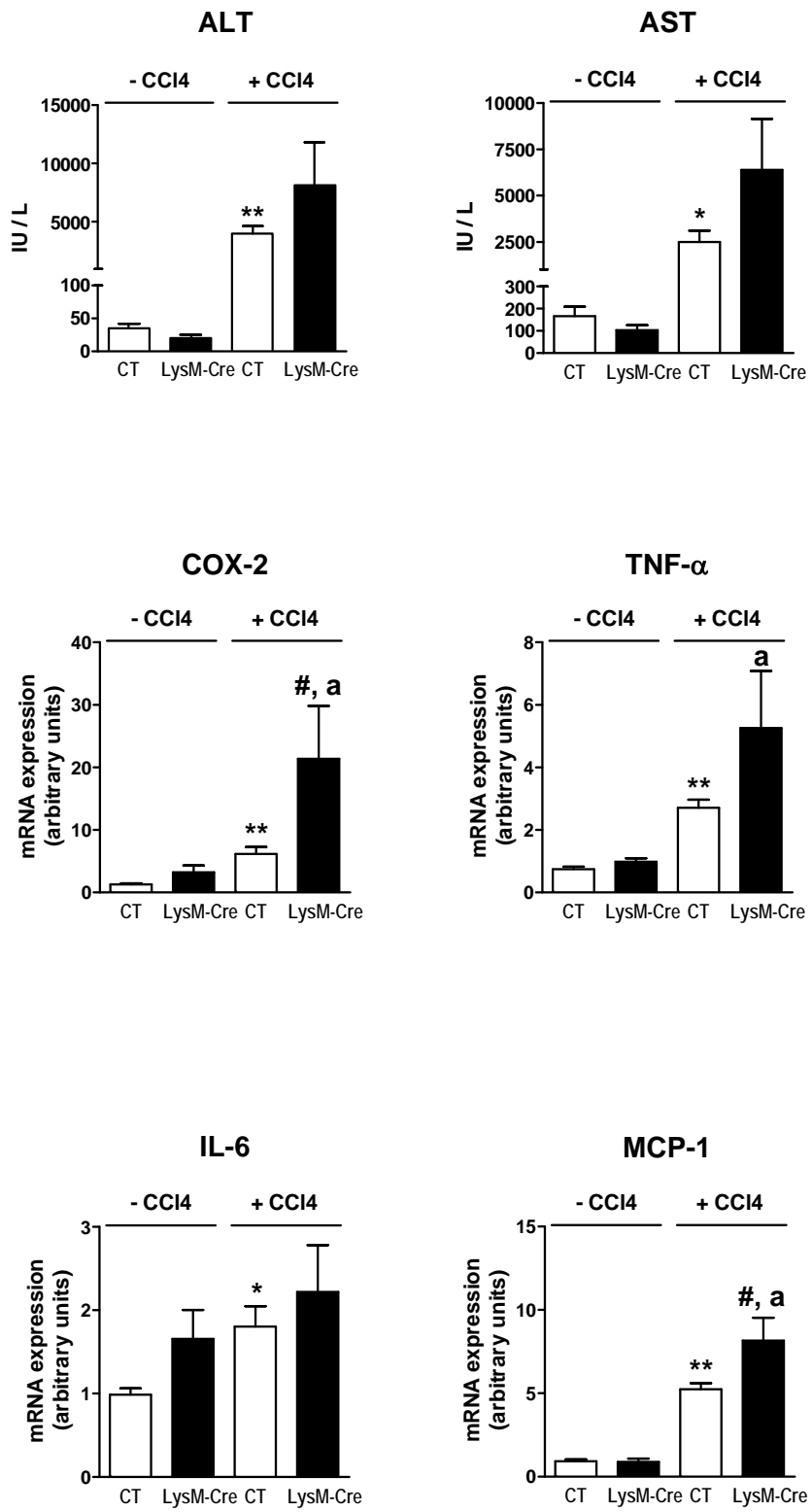
**Supplementary Fig. 3:** *aP2 and PPAR $\gamma$  gene expression in adipocytes and peripheral macrophages.* mRNA expression was assessed by real-time PCR in primary cell cultures of adipocytes (Adip) and resident peritoneal macrophages (Mac) from wild-type mice.

**Supplementary Fig. 4:** *Baseline phenotype of aP2-Cre PPAR $\gamma$  deficient mice.* Body weight, white adipose tissue (WAT) weight, liver weight, glucose tolerance test (GTT) and corresponding calculated area under the curve (AUC), serum ALT and AST levels and expression of profibrogenic genes from 16-week old control (CT) (n= 6) and aP2-Cre (n=6) mice. \*, P<0.05 and \*\*, P<0.01 versus CT mice.

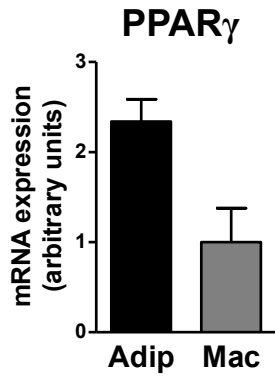
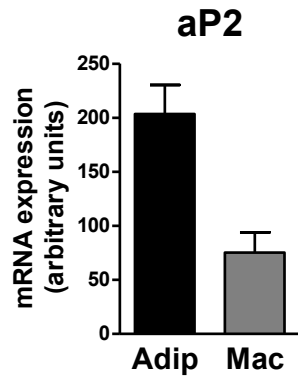


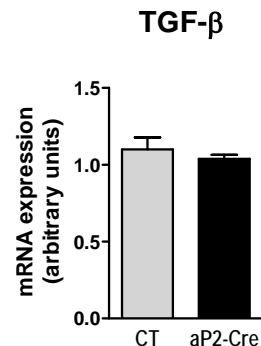
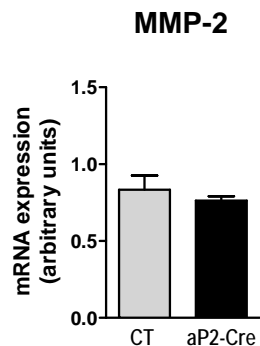
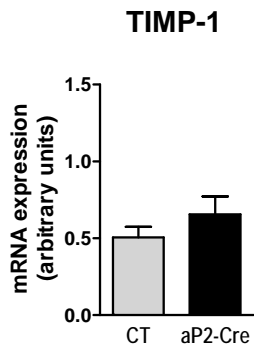
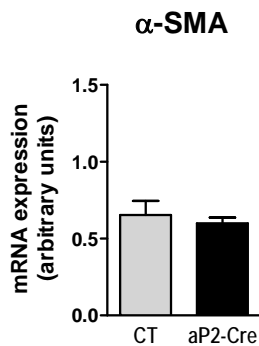
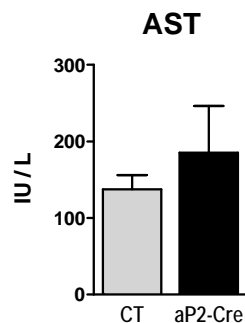
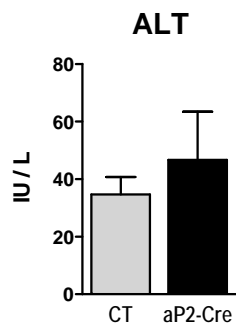
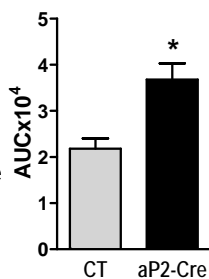
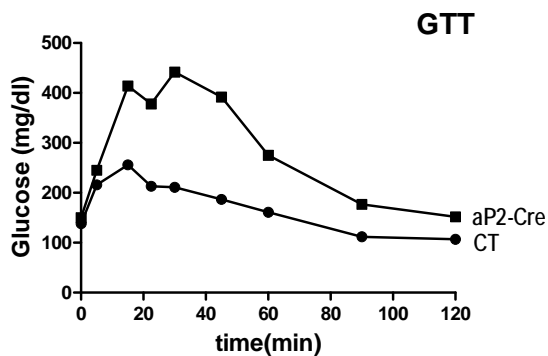
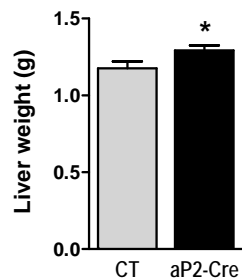
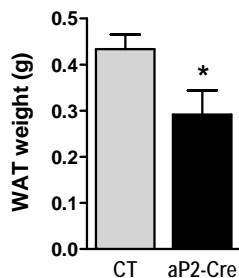
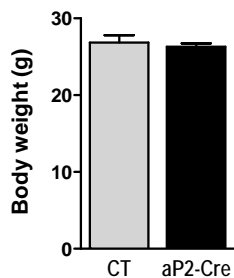


**A****B****C****D**



Supplementary Figure 2





Supplementary Figure 4

**Supplementary Table 1.** Sequences and expected product sizes for PCR primers employed in the genotyping procedures.

Gene	Primer Sequence	Expected Product Size (bp)
Floxed PPAR $\gamma$ (F1) Floxed PPAR $\gamma$ (R1)	5'-CTAGTGAAGTATACTATACTGTGCAGCC 5'-GTGTCATAATAAACATGGGAGCATAGAAGC	160/200
PPAR $\gamma$ (F2) LacZ (R2)	5'-AGGCCACCATGGAAAGCCACAGTTCCTC 5'-GCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAG	230
Alb-Cre (F3) Cre (R3)	5'-GCTCCAGATGGCAAACATACGCAAGG 5'-GAACGCTAGAGCCTGTTTTGCACGTTC	700
LysM-Cre (F4) Cre (R4)	5'-GCATTACCGGTCGATGCAACGAGTG 5'-GAACGCTAGAGCCTGTTTTGCACGTTC	380
aP2-Cre (F5) Cre (R5)	5'-GAGCTATCTGGACTTCAGAGGCTC 5'-GAACGCTAGAGCCTGTTTTGCACGTTC	600

*Abbreviations:* F; forward. R; reverse



**DISCUSIÓN**

---





La EHGNA comprende un espectro de alteraciones hepáticas desde la esteatosis simple hasta la esteatohepatitis, la cual puede progresar a etapas muy severas de la enfermedad como la fibrosis y la cirrosis. PPAR $\gamma$  se considera un factor que actúa en la patogenia de la enfermedad. Por este motivo en la presente tesis hemos realizados un análisis exhaustivo de la contribución relativa que ejerce la expresión de PPAR $\gamma$  en células hepáticas parenquimales y no parenquimales en la EHGNA y el daño hepático. Para ello hemos utilizado dos modelos experimentales *in vivo*: el modelo de obesidad inducida por dieta rica en grasa para estudiar el estadio de esteatosis simple y el modelo de toxicidad por administración crónica de CCl<sub>4</sub> para producir daño hepático (inflamación más fibrosis).

La expresión de las dos isoformas de PPAR $\gamma$  incrementó significativamente en los hígados de los animales sometidos al modelo de dieta rica en grasa. Estos resultados son consistentes con evidencias que relacionan la sobreexpresión de PPAR $\gamma$  en el hígado con la presencia extendida de esteatosis hepática (**Vidal-Puig A et al, J Clin Invest 1996; Bedoucha M et al, J Hepatol 2001; Rahimian R et al, Mol Cell Biochem 2001; Westerbacka J et al, Diabetes 2007; Pettinelli P et al, JC 2011**). En esta línea, se detectó un aumento en los niveles de proteína de la isoforma 2 de PPAR $\gamma$  en la octava semana de administración de CCl<sub>4</sub> en el modelo de daño hepático. Estos resultados correlacionan con la presencia de esteatosis en el hígado afectado. Por otra parte, la isoforma 1 de PPAR $\gamma$  disminuyó gradualmente su expresión proteica a medida que avanza el daño hepático por el tratamiento crónico con CCl<sub>4</sub>.

La novedad de nuestra investigación consistió en comparar las funciones que ejerce PPAR $\gamma$  en más de un tipo celular del hígado relevante en la patofisiología de la EHGNA y para ello utilizamos la tecnología Cre-*loxP*. PPAR $\gamma$  se inactivó específicamente en hepatocitos utilizando el promotor de la albumina para expresar Cre ya que se identifica como la célula parenquimal más abundante en

el hígado, involucrada en multitud de procesos metabólicos y mayor efectora de la esteatosis hepática. El receptor nuclear también se delecionó en los macrófagos, representados en el hígado por las células de Kupffer, ya que es una célula no parenquimal de gran importancia biológica que participa en procesos de resistencia a la insulina y en las respuestas inflamatorias frente a daños hepáticos. En particular, se utilizó el promotor de la lisozima M expresado por monocitos/macrófagos pero además por otras células de la línea mieloide como los neutrofilos que también están implicados en procesos inflamatorios hepáticos (**Bataller R et al, JCI 2005**). En este sentido y en línea con los resultados obtenidos en el segundo estudio, recientemente se ha demostrado que la expresión del variante negativo de PPAR $\gamma$  en células mieloides causa inflamación severa y desarrollo de tumores en diferentes tejidos (**Wu L et al, Blood 2012**). En el segundo estudio también se delecionó PPAR $\gamma$  en CEH debido a su importante papel en el proceso fibrogénico hepático. En nuestra investigación hemos escogido el promotor del gen  $\alpha 2$  para expresar la recombinasa Cre específicamente en la CEH. Aunque se han descrito otra variedad de promotores para seleccionar específicamente CEH (como el colágeno I subunidad  $\alpha 1$ , el colágeno I subunidad  $\alpha 2$ , la desmina o la proteína ácida fibrilar glial (GFAP)), estos promotores no han logrado inducir robustamente la expresión de Cre y/o su expresión se producía en otros tipos celulares (**Kinoshita K et al, Gut 2007; Govoni KE et al, Endocrinology 2007; Kisseleva T et al, PNAS 2012**). La elección del promotor del gen  $\alpha 2$  se basa en que en el hígado se expresa esencialmente en las células no parenquimales, principalmente en las CEH. En este sentido, también hemos comprobado que los niveles de expresión proteica de PPAR $\gamma$  se reducen marcadamente en las CHE quiescentes y se encuentran ligeramente reducidos en las CK de ratones KO específicos de CEH. El modelo de KO específico de CEH utilizando el promotor de  $\alpha 2$  requiere un análisis más extenso sobre posibles efectos secundarios ya que  $\alpha 2$  se expresa principalmente en el tejido adiposo. La deficiencia de PPAR $\gamma$  en el tejido adiposo de este modelo de KO puede producir efectos sistémicos como la inducción de la polarización de los macrófagos hacia el fenotipo inflamatorio M1 en el hígado (**Koutnikova et al, PNAS 2003; He et al, PNAS**

**2003; Jones JR et al, PNAS 2005; Odegaard JL et al, Nature 2007**), pero este efecto no se ve afectado en el hígado ya que se ha identificado a PPAR $\delta$  como responsable de la polarización de las células de Kupffer (**Odegaard JL et al, Cell Metab 2008**).

Los efectos de PPAR $\gamma$  modulando características de la EHGNA son debidos a la acción que ejerce en las diferentes células del hígado, en otros tejidos y en diversas vías de señalización. En el primer estudio hemos aportado evidencias que demuestran que la expresión de PPAR $\gamma$  en el hígado, específicamente en los hepatocitos, actúa como factor proesteatótico contribuyendo en la progresión de la EHGNA. En cambio los resultados obtenidos en el segundo estudio indican que la expresión de PPAR $\gamma$  en las células no parenquimales juega un papel protector generalizado contra la lesión hepática inflamatoria y fibrogénica, principalmente en las células de Kupffer junto con las CEH.

En el primer estudio demostramos que la expresión y activación de PPAR $\gamma$  en los hepatocitos promueve la formación del hígado graso. Concretamente, confirmamos que la expresión de PPAR $\gamma$  en hígado total principalmente procede de los hepatocitos y aumenta sustancialmente en el modelo de obesidad. Adicionalmente, la ausencia de PPAR $\gamma$  en el hepatocito fue asociada con una reducción significativa de la esteatosis hepática. El papel esteatogénico de PPAR $\gamma$  en el hepatocito fue consistente con los resultados obtenidos en los experimentos *in vitro* en cultivos organotípicos y cultivos primarios de hepatocitos donde la activación de PPAR $\gamma$  por el agonista rosiglitazona incrementó la acumulación de lípidos, mientras que el efecto proesteatótico se suprimió en cultivos con ausencia de PPAR $\gamma$  en el hepatocito o tratados con el antagonista de PPAR $\gamma$  BADGE. Además y en consonancia con previas publicaciones, los resultados obtenidos en los ratones deficientes de PPAR $\gamma$  en el hepatocito tras someterlos al modelo experimental de obesidad indican que el papel proesteatogénico de PPAR $\gamma$  es mediado por mecanismos que implican la sobreexpresión de genes que codifican proteínas lipogénicas e involucradas en el

transporte de lípidos en el hígado acompañado con alteraciones en la tolerancia frente la glucosa (Yu S et al, *JBC* 2003; Gravrilova O et al, *JBC* 2003; Zhang YL et al, *JBC* 2006; Schadinger SE et al, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005). Estos resultados son consistentes con estudios previos que señalan una marcada atenuación en la patología de la EGNHA en los ratones KO de PPAR $\gamma$  en el hepatocito (Gravrilova O et al, *JBC* 2003; Matsusue K et al, *JCI* 2003).

Una segunda célula efectora de las funciones de PPAR $\gamma$  en la EHGNA es el macrófago, ya que recientemente se le han atribuido funciones reguladoras de la obesidad, resistencia a la insulina y tolerancia a la glucosa conjuntamente con sus funciones anti-inflamatorias (Odegaard JI et al, *Nature* 2007). Las células de Kupffer además de jugar el papel principal en la respuesta inflamatoria hepática, según estudios recientes pueden también participar en la patogénesis del hígado graso ya que su depleción podía reprimir o agravar la resistencia a la insulina y la esteatosis hepática en modelos de DRG (Lanthier N et al, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010; Stienstra R et al, *Hepatology* 2010; Huang W et al, *Diabetes* 2010). Nuestros resultados indican que la acumulación de lípidos intrahepáticos se redujo parcialmente en el hígado de ratones deficientes para PPAR $\gamma$  en los macrófagos sometidos a una DRG, aunque no se observaron cambios en los niveles de expresión de genes lipogénicos ni en la tolerancia a la glucosa. Cabe destacar la hiperglucemia e intolerancia a la glucosa acompañada de la sobreexpresión de genes glucogénicos que hemos detectado en los ratones KO de PPAR $\gamma$  en el macrófago en un estado normal, pero sin observar cambios en el perfil estado inflamatorio basal. Además, se ha sugerido que las CK ejercen alteraciones en los hepatocitos influenciándolos en el metabolismo de lipídico y glucémico, por ello comprobamos a partir de cultivos organotípicos si existía un diálogo entre las CK y hepatocitos. Nuestros resultados demostraron que la activación de PPAR $\gamma$  en hepatocitos es suficiente para iniciar la acumulación de lípidos ya que la ausencia de PPAR $\gamma$  en las CK no causó ninguna alteración en el hígado. Por lo que respecta al hígado graso, la expresión de PPAR $\gamma$  en el macrófago es necesaria para el mantenimiento de la homeostasis de

glucosa basal y, aunque su activación en células de Kupffer no es crítica para iniciar la esteatosis hepática, su expresión en macrófago participa en la inducción de esteatosis hepática en un estadio de obesidad por DRG.

La ausencia de efectos inflamatorios entre los diferentes KO de PPAR $\gamma$  tras someterlos al modelo de DRG incitó el análisis detallado de las respuestas inflamatorias y fibrogénicas específicamente en un modelo crónico de CCl<sub>4</sub>. Con este modelo fuimos capaces de inducir el daño hepático evitando los factores secundarios del modelo de DRG. De esta forma en el segundo estudio demostramos la función protectora que realiza PPAR $\gamma$  en las células no parenquimales contra la inflamación y fibrosis hepática.

Es interesante destacar que la eliminación de PPAR $\gamma$  en los macrófagos agravó significativamente el daño hepatocelular, la inflamación hepática y exacerbó la fibrosis tras la exposición crónica al CCl<sub>4</sub>. Mientras que en los ratones a los que se eliminó PPAR $\gamma$  en el hepatocito se observó una respuesta similar a la de los ratones control con algunos parámetros heterogéneos. Sorprendentemente, se detectó un aumento significativo en los niveles de peroxidación lipídica en el hígado de los ratones deficientes para PPAR $\gamma$  en los hepatocitos por lo que sugiere que PPAR $\gamma$  en el hepatocito actúa contra el estrés oxidativo. Este efecto protector es consistente con publicaciones recientes sobre la acción que ejerce PPAR $\gamma$  contra el estrés oxidativo celular induciendo la expresión de la enzima superóxido dismutasa y estabilizando las mitocondrias (**Ding G et al, Cardiovasc Res 2007; Fuenzalida K et al, JBC 2007**). En línea con esta observación, la ausencia de diferencias significativas en los niveles de ALT entre las diferentes colonias de KO de PPAR $\gamma$  sugiere que el grado de daño inflamatorio puede ser consecuencia del deterioro mitocondrial producido por la exposición crónica a CCl<sub>4</sub> por encima de la muerte hepatocitaria. Otra observación detectada tras la delección de PPAR $\gamma$  en los hepatocitos es la disminución en las actividades transaminasas después de un tratamiento agudo de CCl<sub>4</sub> o LPS ya que no se

corresponde a una respuesta reducida en el estado inflamatorio. En particular y debido a la función esteatogénica que realiza PPAR $\gamma$  en el hepatocito, podemos pensar que estos efectos son consecuencia de mecanismos compensatorios antiinflamatorios realizados por PPAR $\gamma$  presente en las células de Kupffer.

En el segundo estudio detectamos en el hígado de los ratones KO de PPAR $\gamma$  en macrófago un aumento significativo en la expresión de COX-2, TNF- $\alpha$ , CXCL2 y IL-1 $\beta$ , incremento en el infiltrado inflamatorio a través de la inmunotinción del marcador de superficie de macrófago F4/80, peroxidación de lípidos aumentada, exacerbada fibrosis y ascenso en los genes profibrogénicos  $\alpha$ -SMA y TIMP-1. No obstante algunas observaciones fueron complejas de interpretar como por ejemplo el descenso en la actividad NF- $\kappa$ B debido a la ausencia de PPAR $\gamma$  en hepatocitos y macrófagos. Por un lado se ha demostrado que parte de las funciones antiinflamatorias de PPAR $\gamma$  se deben a la transrepresión de la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B, mientras que NF- $\kappa$ B en el hígado es crucial para la supervivencia celular (**Pascual G et al, Nature 2005; Sun B et al Oncogene 2008**). Del mismo modo, aunque observamos una sobreexpresión en las citoquinas proinflamatorias reguladas por NF- $\kappa$ B (IL-6 y IL-1 $\beta$ ) en los cultivos organotípicos de los ratones deficientes de PPAR $\gamma$  en los macrófagos así como de IL-1 $\beta$  tras el modelo crónico. El descenso en NF- $\kappa$ B observado en el hígado después del modelo de daño hepático se asoció con el papel clave que ejerce NF- $\kappa$ B en la supervivencia hepática ya que la ausencia de PPAR $\gamma$  en los macrófagos resultó en un aumento significativo de apoptosis celular. Al mismo tiempo, los experimentos en cultivos organotípicos de hígado deficientes de PPAR $\gamma$  en macrófago presentaron una reducción parcial y leve en las citoquinas características del fenotipo antiinflamatorio M2. Aunque se ha descrito que PPAR $\gamma$  promueve la activación alternativa del macrófago, nuestros resultados confirman estudios previos que atribuyen a PPAR $\delta$  el control de la activación alternativa de las CK en el hígado centrando la atención de PPAR $\gamma$  en los macrófagos del tejido adiposo (**Odegaard JI et al, Nature 2007; Odegaard JL et al, Cell Metab 2008**).

En el segundo estudio también abordamos el análisis de los efectos hepáticos producidos por la ausencia de expresión de PPAR $\gamma$  en las CEH. Fuimos capaces de demostrar que los ratones deficientes de PPAR $\gamma$  en las CEH desarrollaron daño hepático exacerbado y una respuesta fibrogénica incrementada debido al ascenso en los niveles de hidroxiprolina junto con la extensa deposición de fibra y la sobreexpresión de  $\alpha$ -SMA y TIMP-1. Estos resultados concuerdan con estudios previos que señalaron el papel que ejerce PPAR $\gamma$  en la inhibición de la activación y proliferación de las CEH (**Galli A et al, Gastroenterology 2002; Marra F et al, Gastroenterology 2000; Hazra S et al, JBC 2004**).

Existen efectos antagónicos entre los resultados obtenidos con los fármacos TZDs en relación y las propiedades esteatogénicas de PPAR $\gamma$  en el hígado. En estudios clínicos realizados en pacientes con la EGHNA se ha observado un descenso en la esteatosis hepática, posiblemente como consecuencia de la activación de PPAR $\gamma$  en el tejido adiposo y el aumento en la sensibilidad a la insulina (**Ratzliff V et al, Hepatology 2010**). En cambio tratamientos prolongados con TZDs en modelos animales obesos *ob/ob* o diabéticos KKA<sup>Y</sup> generaron un empeoramiento de la esteatosis hepática presente (**Bedoucha M et al, J Hepatol 2001; Matsusue K et al, JCI 2003**). Por otro lado, aunque no se han observado claramente efectos en la fibrosis y existen publicaciones contrarias a su eficacia una vez la fibrosis se encuentra establecida, estudios *in vitro* y en modelos animales argumentan a favor del efecto preventivo de PPAR $\gamma$  en la fibrosis hepática en terapias de larga duración (**Marra F et al, Gastroenterology 2000; Galli A et al, Gastroenterology 2002; Leclercq IA et al, Gut 2006; Belfort R et al, N Engl J Med 2006; Sanyal AJ et al, N Engl J Med 2006**). En consecuencia, la eficacia terapéutica de los ligandos de PPAR $\gamma$  está limitada frente a los posibles efectos generados en pacientes con un elevado grado de expresión de PPAR $\gamma$  en el hígado, así mismo en el inicio de un posible tratamiento con TZDs depende del tipo de daño, duración del mismo y la severidad del grado de fibrosis siempre teniendo en cuenta los posibles efectos secundarios generados.





**CONCLUSIÓN**

---



Los estudios realizados en la presente tesis indican que:

1. El receptor nuclear PPAR $\gamma$  está sobreexpresado en el modelo de obesidad y esteatosis hepática inducido por DRG.
2. La eliminación del PPAR $\gamma$  en las células hepáticas, principalmente en los hepatocitos, protege a los ratones frente a la esteatosis hepática.
3. La delección específica de PPAR $\gamma$  en los hepatocitos induce cambios en la expresión hepática de genes relacionados con la lipogénesis y el transporte lipídico.
4. La activación de PPAR $\gamma$  en el hepatocito por el agonista rosiglitazona aumenta la acumulación de lípidos neutros en el hígado.
5. La ausencia de PPAR $\gamma$  en los hepatocitos produce una mejora de la tolerancia a la glucosa, reduciendo la expresión de genes involucrados en el metabolismo de los carbohidratos.
6. La expresión de PPAR $\gamma$  en los macrófagos es necesaria para el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa en condiciones basales.
7. Las isoformas del receptor nuclear PPAR $\gamma$  presentan niveles de expresión opuestos durante el daño hepático crónico, PPAR $\gamma$ 1 desciende mientras que PPAR $\gamma$ 2 incrementa los niveles de proteína en el hígado.
8. La eliminación de PPAR $\gamma$  en los macrófagos exacerba el daño necroinflamatorio en el hígado en un estado patológico.
9. Los efectos perjudiciales de la ausencia de PPAR $\gamma$  en las células de Kupffer frente a un daño inflamatorio fueron confirmados en cultivos organotípicos de hígado.
10. La activación de PPAR $\gamma$  en el hígado, y parcialmente en las células de Kupffer, por el agonista rosiglitazona mejora la respuesta inflamatoria.
11. La delección específica de PPAR $\gamma$  en los macrófagos o las CEH agrava notablemente la respuesta fibrogénica frente a una lesión crónica inducida por CCl<sub>4</sub>.

En conjunto, los resultados de este trabajo ayudan a comprender las funciones que realiza PPAR $\gamma$  en el hígado y su contribución en la EHGNA. A diferencia de los hepatocitos, donde la expresión de PPAR $\gamma$  juega un papel en la deposición hepática de lípidos contribuyendo a la patogénesis de la EHGNA, PPAR $\gamma$  ejerce papeles antiinflamatorios y antifibróticos en las células hepáticas no parenquimales (los macrófagos y las células estrelladas hepáticas). En conclusión, nuestros hallazgos sugieren la existencia de papeles específicos en cada tipo celular hepático y de funciones divergentes e incluso opuestas para PPAR $\gamma$  en la patogénesis de la EHGNA y el daño hepático.

## **BIBLIOGRAFIA**

---



- Ahmadian M, Suh JM, Hah N, Liddle C, Atkins AR, Downes M, Evans RM. PPARgamma signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med* 19: 557-66, 2013.
- Aithal GP, Thomas JA, Kaye PV, Lawson A, Ryder SD, Spendlove I, Austin AS, Freeman JG, Morgan L, Webber J. Randomized, placebo-controlled trial of pioglitazone in nondiabetic subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 135: 1176-84, 2008.
- Akiyama TE, Sakai S, Lambert G, Nicol CJ, Matsusue K, Pimprale S, Lee YH, Ricote M, Glass CK, Brewer HB, Jr., Gonzalez FJ. Conditional disruption of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene in mice results in lowered expression of ABCA1, ABCG1, and apoE in macrophages and reduced cholesterol efflux. *Mol Cell Biol* 22: 2607-19, 2002.
- Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 346: 1221-31, 2002.
- Anstee QM, Goldin RD. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. *Int J Exp Pathol* 87: 1-16, 2006.
- Babaev VR, Yancey PG, Ryzhov SV, Kon V, Breyer MD, Magnuson MA, Fazio S, Linton MF. Conditional knockout of macrophage PPARgamma increases atherosclerosis in C57BL/6 and low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 1647-53, 2005.
- Baffy G. Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease: the emerging view. *J Hepatol* 51: 212-23, 2009.
- Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, Koder A, Evans RM. PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell* 4: 585-95, 1999.
- Barak Y, Kim S. Genetic manipulations of PPARs: effects on obesity and metabolic disease. *PPAR Res* 2007:12781.: 12781, 2007.
- Barish GD, Narkar VA, Evans RM. PPAR delta: a dagger in the heart of the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 116: 590-7, 2006.
- Barroso I, Gurnell M, Crowley VE, Agostini M, Schwabe JW, Soos MA, Maslen GL, Williams TD, Lewis H, Schafer AJ, Chatterjee VK, O'Rahilly S. Dominant negative mutations in human PPARgamma associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. *Nature* 402: 880-3, 1999.
- Battaller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 115: 209-18, 2005.
- Bechmann LP, Hannivoort RA, Gerken G, Hotamisligil GS, Trauner M, Canbay A. The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. *J Hepatol* 56: 952-64, 2012.
- Bedoucha M, Atzpodien E, Boelsterli UA. Diabetic KKAy mice exhibit increased hepatic PPARgamma1 gene expression and develop hepatic steatosis upon chronic treatment with antidiabetic thiazolidinediones. *J Hepatol* 35: 17-23, 2001.
- Belfort R, Harrison SA, Brown K, Darland C, Finch J, Hardies J, Balas B, Gastaldelli A, Tio F, Pulcini J, Berria R, Ma JZ, Dwivedi S, Havranek R, Fincke C, DeFronzo R, Bannayan GA, Schenker S, Cusi K. A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 355: 2297-307, 2006.
- Betteridge DJ. Thiazolidinediones and fracture risk in patients with Type 2 diabetes. *Diabet Med* 28: 759-71, 2011.
- Bilzer M, Roggel F, Gerbes AL. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int* 26: 1175-86, 2006.

Bouhlel MA, Derudas B, Rigamonti E, Dievart R, Brozek J, Haulon S, Zawadzki C, Jude B, Torpier G, Marx N, Staels B, Chinetti-Gbaguidi G. PPAR $\gamma$  activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab* 6: 137-43, 2007.

Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest* 114: 147-52, 2004.

Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 94: 2467-74, 1999.

Cariou B, Charbonnel B, Staels B. Thiazolidinediones and PPAR $\gamma$  agonists: time for a reassessment. *Trends Endocrinol Metab* 23: 205-15, 2012.

Charlton MR, Burns JM, Pedersen RA, Watt KD, Heimbach JK, Dierkhising RA. Frequency and outcomes of liver transplantation for nonalcoholic steatohepatitis in the United States. *Gastroenterology* 141: 1249-53, 2011.

Chen W, Chang B, Li L, Chan L. Patatin-like phospholipase domain-containing 3/adiponutrin deficiency in mice is not associated with fatty liver disease. *Hepatology* 52: 1134-42, 2010.

Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm Res* 49: 497-505, 2000.

Choi JH, Banks AS, Kamenecka TM, Busby SA, Chalmers MJ, Kumar N, Kuruvilla DS, Shin Y, He Y, Bruning JB, Marciano DP, Cameron MD, Laznik D, Jurczak MJ, Schurer SC, Vidovic D, Shulman GI, Spiegelman BM, Griffin PR. Antidiabetic actions of a non-agonist PPAR $\gamma$  ligand blocking Cdk5-mediated phosphorylation. *Nature* 477: 477-81, 2011.

Claria J, and Jiménez W. [Renal dysfunction and ascities in carbon tetracholide-induced cirrhosis in rats]. *Ascites and Renal Dysfunction in Liver Disease. Blackwell Science, Malden, MA* 379-96, 1999. ISBN: 978-1-4051-1804-0

Claria J, Horrillo R, Martinez-Clemente M, Moran-Salvador E, Titos E, Gonzalez-Periz A, Ferre N. [Basic mechanisms of hepatocellular injury. Role of inflammatory lipid mediators]. *Gastroenterol Hepatol* 31: 682-92, 2008.

Clausen BE, Burkhardt C, Reith W, Renkawitz R, Forster I. Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res* 8: 265-77, 1999.

Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science* 332: 1519-23, 2011.

Cui Y, Miyoshi K, Claudio E, Siebenlist UK, Gonzalez FJ, Flaws J, Wagner KU, Hennighausen L. Loss of the peroxisome proliferation-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) does not affect mammary development and propensity for tumor formation but leads to reduced fertility. *J Biol Chem* 277: 17830-5, 2002.

Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 114: 842-5, 1998.

Desreumaux P, Dubuquoy L, Nutten S, Peuchmaur M, Englaro W, Schoonjans K, Derijard B, Desvergne B, Wahli W, Chambon P, Leibowitz MD, Colombel JF, Auwerx J. Attenuation of colon inflammation through activators of the retinoid X receptor (RXR)/peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) heterodimer. A basis for new therapeutic strategies. *J Exp Med* 193: 827-38, 2001.

Ding G, Fu M, Qin Q, Lewis W, Kim HW, Fukai T, Bacanamwo M, Chen YE, Schneider MD, Mangelsdorf DJ, Evans RM, Yang Q. Cardiac peroxisome proliferator-activated receptor gamma is essential in protecting cardiomyocytes from oxidative damage. *Cardiovasc Res* 76: 269-79, 2007.



- Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 115: 1343-51, 2005.
- Dreyer C, Krey G, Keller H, Givel F, Helftenbein G, Wahli W. Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell* 68: 879-87, 1992.
- Duan SZ, Ivashchenko CY, Russell MW, Milstone DS, Mortensen RM. Cardiomyocyte-specific knockout and agonist of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma both induce cardiac hypertrophy in mice. *Circ Res* 97: 372-9, 2005.
- Edwards IJ, O'Flaherty JT. Omega-3 Fatty Acids and PPARgamma in Cancer. *PPAR Res* 2008:358052. doi: 10.1155/2008/358052.: 358052, 2008.
- Feige JN, Gelman L, Michalik L, Desvergne B, Wahli W. From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. *Prog Lipid Res* 45: 120-59, 2006.
- Florez JC, Hirschhorn J, Altshuler D. The inherited basis of diabetes mellitus: implications for the genetic analysis of complex traits. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 4:257-91.: 257-91, 2003.
- Floyd ZE, Stephens JM. Controlling a master switch of adipocyte development and insulin sensitivity: covalent modifications of PPARgamma. *Biochim Biophys Acta* 1822: 1090-5, 2012.
- Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* 83: 803-12, 1995.
- Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 275: 2247-50, 2000.
- Fuenzalida K, Quintanilla R, Ramos P, Piderit D, Fuentealba RA, Martinez G, Inestrosa NC, Bronfman M. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma up-regulates the Bcl-2 anti-apoptotic protein in neurons and induces mitochondrial stabilization and protection against oxidative stress and apoptosis. *J Biol Chem* 282: 37006-15, 2007.
- Fujii H, Kawada N. Inflammation and fibrogenesis in steatohepatitis. *J Gastroenterol* 47: 215-25, 2012.
- Galli A, Crabb DW, Ceni E, Salzano R, Mello T, Svegliati-Baroni G, Ridolfi F, Trozzi L, Surrenti C, Casini A. Antidiabetic thiazolidinediones inhibit collagen synthesis and hepatic stellate cell activation in vivo and in vitro. *Gastroenterology* 122: 1924-40, 2002.
- Garcia-Ruiz I, Rodriguez-Juan C, az-Sanjuan T, Martinez MA, Munoz-Yague T, Solis-Herruzo JA. Effects of rosiglitazone on the liver histology and mitochondrial function in ob/ob mice. *Hepatology* 46: 414-23, 2007.
- Gavrilova O, Haluzik M, Matsusue K, Cutson JJ, Johnson L, Dietz KR, Nicol CJ, Vinson C, Gonzalez FJ, Reitman ML. Liver peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass. *J Biol Chem* 278: 34268-76, 2003.
- Ghisletti S, Huang W, Ogawa S, Pascual G, Lin ME, Willson TM, Rosenfeld MG, Glass CK. Parallel SUMOylation-dependent pathways mediate gene- and signal-specific transrepression by LXRs and PPARgamma. *Mol Cell* 25: 57-70, 2007.
- Gonzalez-Periz A, Planaguma A, Gronert K, Miquel R, Lopez-Parra M, Titos E, Horrillo R, Ferre N, Deulofeu R, Arroyo V, Rodes J, Claria J. Docosahexaenoic acid (DHA) blunts liver injury by conversion to protective lipid mediators: protectin D1 and 17S-hydroxy-DHA. *FASEB J* 20: 2537-9, 2006.

Govoni KE, Wergedal JE, Florin L, Angel P, Baylink DJ, Mohan S. Conditional deletion of insulin-like growth factor-I in collagen type 1 $\alpha$ 2-expressing cells results in postnatal lethality and a dramatic reduction in bone accretion. *Endocrinology* 148: 5706-15, 2007.

Graves RA, Tontonoz P, Spiegelman BM. Analysis of a tissue-specific enhancer: ARF6 regulates adipogenic gene expression. *Mol Cell Biol* 12: 1202-8, 1992.

Guan HP, Ishizuka T, Chui PC, Lehrke M, Lazar MA. Corepressors selectively control the transcriptional activity of PPAR $\gamma$  in adipocytes. *Genes Dev* 19: 453-61, 2005.

Guan Y, Hao C, Cha DR, Rao R, Lu W, Kohan DE, Magnuson MA, Redha R, Zhang Y, Breyer MD. Thiazolidinediones expand body fluid volume through PPAR $\gamma$  stimulation of ENaC-mediated renal salt absorption. *Nat Med* 11: 861-6, 2005.

Gupta AC, Chaudhory AK, Sukriti, Pande C, Sakhuja P, Singh Y, Basir SF, Sarin SK. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 Pro12Ala variant is associated with body mass index in non-alcoholic fatty liver disease patients. *Hepatology* 51: 575-80, 2010.

Hayashi H, Sakai T. Animal models for the study of liver fibrosis: new insights from knockout mouse models. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 300: G729-G738, 2011.

Hazra S, Xiong S, Wang J, Rippe RA, Krishna V, Chatterjee K, Tsukamoto H. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces a phenotypic switch from activated to quiescent hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 279: 11392-401, 2004.

He S, McPhaul C, Li JZ, Garuti R, Kinch L, Grishin NV, Cohen JC, Hobbs HH. A sequence variation (I148M) in PNPLA3 associated with nonalcoholic fatty liver disease disrupts triglyceride hydrolysis. *J Biol Chem* 285: 6706-15, 2010.

He W, Barak Y, Hevener A, Olson P, Liao D, Le J, Nelson M, Ong E, Olefsky JM, Evans RM. Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor gamma knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 15712-7, 2003.

Hebbard L, George J. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 8: 35-44, 2011.

Heikkinen S, Auwerx J, Argmann CA. PPAR $\gamma$  in human and mouse physiology. *Biochim Biophys Acta* 1771: 999-1013, 2007.

Hevener AL, Olefsky JM, Reichart D, Nguyen MT, Bandyopadhyay G, Leung HY, Watt MJ, Benner C, Febbraio MA, Nguyen AK, Folian B, Subramaniam S, Gonzalez FJ, Glass CK, Ricote M. Macrophage PPAR gamma is required for normal skeletal muscle and hepatic insulin sensitivity and full antidiabetic effects of thiazolidinediones. *J Clin Invest* 117: 1658-69, 2007.

Hontecillas R, Bassaganya-Riera J. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is required for regulatory CD4<sup>+</sup> T cell-mediated protection against colitis. *J Immunol* 178: 2940-9, 2007.

Huang W, Metlakunta A, Dedousis N, Zhang P, Sipula I, Dube JJ, Scott DK, O'Doherty RM. Depletion of liver Kupffer cells prevents the development of diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. *Diabetes* 59: 347-57, 2010.

Imai T, Takakuwa R, Marchand S, Dentz E, Bornert JM, Messaddeq N, Wendling O, Mark M, Desvergne B, Wahli W, Chambon P, Metzger D. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is required in mature white and brown adipocytes for their survival in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 4543-7, 2004.

Iredale JP. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J Clin Invest* 117: 539-48, 2007.

- Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347: 645-50, 1990.
- Ivashchenko CY, Duan SZ, Usher MG, Mortensen RM. PPAR-gamma knockout in pancreatic epithelial cells abolishes the inhibitory effect of rosiglitazone on caerulein-induced acute pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293: G319-G326, 2007.
- Jones JR, Barrick C, Kim KA, Lindner J, Blondeau B, Fujimoto Y, Shiota M, Kesterson RA, Kahn BB, Magnuson MA. Deletion of PPARgamma in adipose tissues of mice protects against high fat diet-induced obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 6207-12, 2005.
- Kanda T, Brown JD, Orasanu G, Vogel S, Gonzalez FJ, Sartoretto J, Michel T, Plutzky J. PPARgamma in the endothelium regulates metabolic responses to high-fat diet in mice. *J Clin Invest* 119: 110-24, 2009.
- Kersten S, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest* 103: 1489-98, 1999.
- Kersten S, Desvergne B, Wahli W. Roles of PPARs in health and disease. *Nature* 405: 421-4, 2000.
- Kinoshita K, Iimuro Y, Fujimoto J, Inagaki Y, Namikawa K, Kiyama H, Nakajima Y, Otagawa K, Kawada N, Friedman SL, Ikeda K. Targeted and regulable expression of transgenes in hepatic stellate cells and myofibroblasts in culture and in vivo using an adenoviral Cre/loxP system to antagonise hepatic fibrosis. *Gut* 56: 396-404, 2007.
- Kisseleva T, Cong M, Paik Y, Scholten D, Jiang C, Benner C, Iwaisako K, Moore-Morris T, Scott B, Tsukamoto H, Evans SM, Dillmann W, Glass CK, Brenner DA. Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 9448-53, 2012.
- Kliwer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC, Lehmann JM. A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* 83: 813-9, 1995.
- Kliwer SA, Sundseth SS, Jones SA, Brown PJ, Wisely GB, Koble CS, Devchand P, Wahli W, Willson TM, Lenhard JM, Lehmann JM. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 4318-23, 1997.
- Koliwad SK, Streeper RS, Monetti M, Cornelissen I, Chan L, Terayama K, Naylor S, Rao M, Hubbard B, Farese RV, Jr. DGAT1-dependent triacylglycerol storage by macrophages protects mice from diet-induced insulin resistance and inflammation. *J Clin Invest* 120: 756-67, 2010.
- Koutnikova H, Cock TA, Watanabe M, Houten SM, Champy MF, Dierich A, Auwerx J. Compensation by the muscle limits the metabolic consequences of lipodystrophy in PPAR gamma hypomorphic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 14457-62, 2003.
- Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K, Satoh S, Nakano R, Ishii C, Sugiyama T, Eto K, Tsubamoto Y, Okuno A, Murakami K, Sekihara H, Hasegawa G, Naito M, Toyoshima Y, Tanaka S, Shiota K, Kitamura T, Fujita T, Ezaki O, Aizawa S, Kadowaki T, . PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell* 4: 597-609, 1999.
- Kwan KM. Conditional alleles in mice: practical considerations for tissue-specific knockouts. *Genesis* 32: 49-62, 2002.
- Lanthier N, Molendi-Coste O, Horsmans Y, van RN, Cani PD, Leclercq IA. Kupffer cell activation is a causal factor for hepatic insulin resistance. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 298: G107-G116, 2010.

Leclercq IA, Sempoux C, Starkel P, Horsmans Y. Limited therapeutic efficacy of pioglitazone on progression of hepatic fibrosis in rats. *Gut* 55: 1020-9, 2006.

Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem* 270: 12953-6, 1995.

Lewis JD, Ferrara A, Peng T, Hedderson M, Bilker WB, Quesenberry CP, Jr., Vaughn DJ, Nessel L, Selby J, Strom BL. Risk of bladder cancer among diabetic patients treated with pioglitazone: interim report of a longitudinal cohort study. *Diabetes Care* 34: 916-22, 2011.

Li AC, Brown KK, Silvestre MJ, Willson TM, Palinski W, Glass CK. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest* 106: 523-31, 2000.

Lopez-Parra M, Claria J, Titos E, Planaguma A, Parrizas M, Masferrer JL, Jimenez W, Arroyo V, Rivera F, Rodes J. The selective cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib modulates the formation of vasoconstrictor eicosanoids and activates PPARgamma. Influence of albumin. *J Hepatol* 42: 75-81, 2005.

Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 55: 434-8, 1980.

Lutchman G, Promrat K, Kleiner DE, Heller T, Ghany MG, Yanovski JA, Liang TJ, Hoofnagle JH. Changes in serum adipokine levels during pioglitazone treatment for nonalcoholic steatohepatitis: relationship to histological improvement. *Clin Gastroenterol Hepatol* 4: 1048-52, 2006.

Mahady SE, Webster AC, Walker S, Sanyal A, George J. The role of thiazolidinediones in non-alcoholic steatohepatitis - a systematic review and meta analysis. *J Hepatol* 55: 1383-90, 2011.

Marra F, Efsen E, Romanelli RG, Caligiuri A, Pastacaldi S, Batignani G, Bonacchi A, Caporale R, Laffi G, Pinzani M, Gentilini P. Ligands of peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulate profibrogenic and proinflammatory actions in hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 119: 466-78, 2000.

Matsusue K, Haluzik M, Lambert G, Yim SH, Gavrilova O, Ward JM, Brewer B, Jr., Reitman ML, Gonzalez FJ. Liver-specific disruption of PPARgamma in leptin-deficient mice improves fatty liver but aggravates diabetic phenotypes. *J Clin Invest* 111: 737-47, 2003.

McAlpine CA, Barak Y, Matisse I, Cormier RT. Intestinal-specific PPARgamma deficiency enhances tumorigenesis in ApcMin/+ mice. *Int J Cancer* 119: 2339-46, 2006.

Medina-Gomez G, Virtue S, Lelliott C, Boiani R, Campbell M, Christodoulides C, Perrin C, Jimenez-Linan M, Blount M, Dixon J, Zahn D, Thresher RR, Aparicio S, Carlton M, Colledge WH, Kettunen MI, Seppanen-Laakso T, Sethi JK, O'Rahilly S, Brindle K, Cinti S, Oresic M, Burcelin R, Vidal-Puig A. The link between nutritional status and insulin sensitivity is dependent on the adipocyte-specific peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 isoform. *Diabetes* 54: 1706-16, 2005.

Memon RA, Tecott LH, Nonogaki K, Beigneux A, Moser AH, Grunfeld C, Feingold KR. Up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR-alpha) and PPAR-gamma messenger ribonucleic acid expression in the liver in murine obesity: troglitazone induces expression of PPAR-gamma-responsive adipose tissue-specific genes in the liver of obese diabetic mice. *Endocrinology* 141: 4021-31, 2000.

Miles PD, Barak Y, He W, Evans RM, Olefsky JM. Improved insulin-sensitivity in mice heterozygous for PPAR-gamma deficiency. *J Clin Invest* 105: 287-92, 2000.

Miles PD, Barak Y, Evans RM, Olefsky JM. Effect of heterozygous PPARgamma deficiency and TZD treatment on insulin resistance associated with age and high-fat feeding. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284: E618-E626, 2003.

- Miyazaki Y, Mahankali A, Matsuda M, Mahankali S, Hardies J, Cusi K, Mandarino LJ, DeFronzo RA. Effect of pioglitazone on abdominal fat distribution and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 2784-91, 2002.
- Nagarajan P, Mahesh Kumar MJ, Venkatesan R, Majundar SS, Juyal RC. Genetically modified mouse models for the study of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 18: 1141-53, 2012.
- Nan YM, Han F, Kong LB, Zhao SX, Wang RQ, Wu WJ, Yu J. Adenovirus-mediated peroxisome proliferator activated receptor gamma overexpression prevents nutritional fibrotic steatohepatitis in mice. *Scand J Gastroenterol* 46: 358-69, 2011.
- Nawrocki AR, Rajala MW, Tomas E, Pajvani UB, Saha AK, Trumbauer ME, Pang Z, Chen AS, Ruderman NB, Chen H, Rossetti L, Scherer PE. Mice lacking adiponectin show decreased hepatic insulin sensitivity and reduced responsiveness to peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J Biol Chem* 281: 2654-60, 2006.
- Nissen SE, Wolski K. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *N Engl J Med* 356: 2457-71, 2007.
- Nolan JJ, Ludvik B, Beerdsen P, Joyce M, Olefsky J. Improvement in glucose tolerance and insulin resistance in obese subjects treated with troglitazone. *N Engl J Med* 331: 1188-93, 1994.
- Norris AW, Chen L, Fisher SJ, Szanto I, Ristow M, Jozsi AC, Hirshman MF, Rosen ED, Goodyear LJ, Gonzalez FJ, Spiegelman BM, Kahn CR. Muscle-specific PPARgamma-deficient mice develop increased adiposity and insulin resistance but respond to thiazolidinediones. *J Clin Invest* 112: 608-18, 2003.
- Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Goforth MH, Morel CR, Subramanian V, Mukundan L, Red EA, Vats D, Brombacher F, Ferrante AW, Chawla A. Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature* 447: 1116-20, 2007.
- Ogawa W, Kasuga M. Cell signaling. Fat stress and liver resistance. *Science* 322: 1483-4, 2008.
- Pagano G, Pacini G, Musso G, Gambino R, Mecca F, Depetris N, Cassader M, David E, Cavallo-Perin P, Rizzetto M. Nonalcoholic steatohepatitis, insulin resistance, and metabolic syndrome: further evidence for an etiologic association. *Hepatology* 35: 367-72, 2002.
- Pan X, Hussain FN, Iqbal J, Feuerman MH, Hussain MM. Inhibiting proteasomal degradation of microsomal triglyceride transfer protein prevents CCl4-induced steatosis. *J Biol Chem* 282: 17078-89, 2007.
- Pascual G, Fong AL, Ogawa S, Gamliel A, Li AC, Perissi V, Rose DW, Willson TM, Rosenfeld MG, Glass CK. A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. *Nature* 437: 759-63, 2005.
- Pettinelli P, Videla LA. Up-regulation of PPAR-gamma mRNA expression in the liver of obese patients: an additional reinforcing lipogenic mechanism to SREBP-1c induction. *J Clin Endocrinol Metab* 96: 1424-30, 2011.
- Rahimian R, Masih-Khan E, Lo M, van BC, McManus BM, Dube GP. Hepatic over-expression of peroxisome proliferator activated receptor gamma2 in the ob/ob mouse model of non-insulin dependent diabetes mellitus. *Mol Cell Biochem* 224: 29-37, 2001.
- Ramadori G, Moriconi F, Malik I, Dudas J. Physiology and pathophysiology of liver inflammation, damage and repair. *J Physiol Pharmacol* 59 Suppl 1:107-17.: 107-17, 2008.
- Rangwala SM, Rhoades B, Shapiro JS, Rich AS, Kim JK, Shulman GI, Kaestner KH, Lazar MA. Genetic modulation of PPARgamma phosphorylation regulates insulin sensitivity. *Dev Cell* 5: 657-63, 2003.

Ratziu V, Giral P, Jacqueminet S, Charlotte F, Hartemann-Heurtier A, Serfaty L, Podevin P, Lacorte JM, Bernhardt C, Bruckert E, Grimaldi A, Poynard T. Rosiglitazone for nonalcoholic steatohepatitis: one-year results of the randomized placebo-controlled Fatty Liver Improvement with Rosiglitazone Therapy (FLIRT) Trial. *Gastroenterology* 135: 100-10, 2008.

Ratziu V, Charlotte F, Bernhardt C, Giral P, Halbron M, Lenaour G, Hartmann-Heurtier A, Bruckert E, Poynard T. Long-term efficacy of rosiglitazone in nonalcoholic steatohepatitis: results of the fatty liver improvement by rosiglitazone therapy (FLIRT 2) extension trial. *Hepatology* 51: 445-53, 2010.

Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 391: 79-82, 1998.

Ricote M, Glass CK. PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochim Biophys Acta* 1771: 926-35, 2007.

Rius B, Lopez-Vicario C, Gonzalez-Periz A, Moran-Salvador E, Garcia-Alonso V, Claria J, Titos E. Resolution of inflammation in obesity-induced liver disease. *Front Immunol* 3:257. doi: 10.3389/fimmu.2012.00257. Epub@2012 Aug@20.: 257, 2012.

Rockey DC. Translating an understanding of the pathogenesis of hepatic fibrosis to novel therapies. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 11:224-31. doi: 10.1016/j.cgh.2013.01.005. Epub@ 2013 Jan @7. 224-31, 2013.

Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, Boerwinkle E, Cohen JC, Hobbs HH. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet* 40: 1461-5, 2008.

Rosen ED, Kulkarni RN, Sarraf P, Ozcan U, Okada T, Hsu CH, Eisenman D, Magnuson MA, Gonzalez FJ, Kahn CR, Spiegelman BM. Targeted elimination of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in beta cells leads to abnormalities in islet mass without compromising glucose homeostasis. *Mol Cell Biol* 23: 7222-9, 2003.

Sanyal AJ, Mofrad PS, Contos MJ, Sargeant C, Luketic VA, Sterling RK, Stravitz RT, Shiffman ML, Clore J, Mills AS. A pilot study of vitamin E versus vitamin E and pioglitazone for the treatment of nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2: 1107-15, 2004.

Schadinger SE, Bucher NL, Schreiber BM, Farmer SR. PPARgamma2 regulates lipogenesis and lipid accumulation in steatotic hepatocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: E1195-E1205, 2005.

Semple RK, Chatterjee VK, O'Rahilly S. PPAR gamma and human metabolic disease. *J Clin Invest* 116: 581-9, 2006.

Setoguchi K, Misaki Y, Terauchi Y, Yamauchi T, Kawahata K, Kadowaki T, Yamamoto K. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma haploinsufficiency enhances B cell proliferative responses and exacerbates experimentally induced arthritis. *J Clin Invest* 108: 1667-75, 2001.

Shibuya A, Watanabe M, Fujita Y, Saigenji K, Kuwao S, Takahashi H, Takeuchi H. An autopsy case of troglitazone-induced fulminant hepatitis. *Diabetes Care* 21: 2140-3, 1998.

Simon DM, Arkan MC, Srisuma S, Bhattacharya S, Tsai LW, Ingenito EP, Gonzalez F, Shapiro SD, Mariani TJ. Epithelial cell PPAR[gamma] contributes to normal lung maturation. *FASEB J* 20: 1507-9, 2006.

Smith BW, Adams LA. Non-alcoholic fatty liver disease. *Crit Rev Clin Lab Sci* 48: 97-113, 2011.

Spiegelman BM. PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes* 47: 507-14, 1998.



- Sporn MB, Suh N, Mangelsdorf DJ. Prospects for prevention and treatment of cancer with selective PPARgamma modulators (SPARMs). *Trends Mol Med* 7: 395-400, 2001.
- Stienstra R, Saudale F, Duval C, Keshtkar S, Groener JE, van RN, Staels B, Kersten S, Muller M. Kupffer cells promote hepatic steatosis via interleukin-1beta-dependent suppression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha activity. *Hepatology* 51: 511-22, 2010.
- Sun B, Karin M. NF-kappaB signaling, liver disease and hepatoprotective agents. *Oncogene* 27: 6228-44, 2008.
- Tiikkainen M, Hakkinen AM, Korsheninnikova E, Nyman T, Makimattila S, Yki-Jarvinen H. Effects of rosiglitazone and metformin on liver fat content, hepatic insulin resistance, insulin clearance, and gene expression in adipose tissue in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 53: 2169-76, 2004.
- Tilg H, Moschen AR. Insulin resistance, inflammation, and non-alcoholic fatty liver disease. *Trends Endocrinol Metab* 19: 371-9, 2008.
- Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* 52: 1836-46, 2010.
- Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM. PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 93: 241-52, 1998.
- Tontonoz P, Spiegelman BM. Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annu Rev Biochem* 77:289-312. doi: 10.1146/annurev.biochem.77.061307.091829.: 289-312, 2008.
- Trauner M, Arrese M, Wagner M. Fatty liver and lipotoxicity. *Biochim Biophys Acta* 1801: 299-310, 2010.
- Tsai YS, Kim HJ, Takahashi N, Kim HS, Hagaman JR, Kim JK, Maeda N. Hypertension and abnormal fat distribution but not insulin resistance in mice with P465L PPARgamma. *J Clin Invest* 114: 240-9, 2004.
- Valenti L, Al-Serri A, Daly AK, Galmozzi E, Rametta R, Dongiovanni P, Nobili V, Mozzi E, Roviario G, Vanni E, Bugianesi E, Maggioni M, Fracanzani AL, Fargion S, Day CP. Homozygosity for the patatin-like phospholipase-3/adiponutrin I148M polymorphism influences liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 51: 1209-17, 2010.
- Vidal-Puig AJ, Considine RV, Jimenez-Linan M, Werman A, Pories WJ, Caro JF, Flier JS. Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *J Clin Invest* 99: 2416-22, 1997.
- Wan Y, Saghatelian A, Chong LW, Zhang CL, Cravatt BF, Evans RM. Maternal PPAR gamma protects nursing neonates by suppressing the production of inflammatory milk. *Genes Dev* 21: 1895-908, 2007.
- Wang Z, Xu JP, Zheng YC, Chen W, Sun YW, Wu ZY, Luo M. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits hepatic fibrosis in rats. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 10: 64-71, 2011.
- Welters HJ, El OA, Kawamori D, Meyer J, Hu J, Smith DM, Kulkarni RN. Rosiglitazone promotes PPARgamma-dependent and -independent alterations in gene expression in mouse islets. *Endocrinology* 153: 4593-9, 2012.
- Werman A, Hollenberg A, Solanes G, Bjorbaek C, Vidal-Puig AJ, Flier JS. Ligand-independent activation domain in the N terminus of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma). Differential activity of PPARgamma1 and -2 isoforms and influence of insulin. *J Biol Chem* 272: 20230-5, 1997.
- Westerbacka J, Kolak M, Kiviluoto T, Arkkila P, Siren J, Hamsten A, Fisher RM, Yki-Jarvinen H. Genes involved in fatty acid partitioning and binding, lipolysis, monocyte/macrophage recruitment, and inflammation are overexpressed in the human fatty liver of insulin-resistant subjects. *Diabetes* 56: 2759-65, 2007.

Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Murakami K, Motojima K, Komeda K, Ide T, Kubota N, Terauchi Y, Tobe K, Miki H, Tsuchida A, Akanuma Y, Nagai R, Kimura S, Kadowaki T. The mechanisms by which both heterozygous peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) deficiency and PPARgamma agonist improve insulin resistance. *J Biol Chem* 276: 41245-54, 2001.

Yang L, Stimpson SA, Chen L, Wallace HW, Rockey DC. Effectiveness of the PPARgamma agonist, GW570, in liver fibrosis. *Inflamm Res* 59: 1061-71, 2010.

Yu J, Zhang S, Chu ES, Go MY, Lau RH, Zhao J, Wu CW, Tong L, Zhao J, Poon TC, Sung JJ. Peroxisome proliferator-activated receptors gamma reverses hepatic nutritional fibrosis in mice and suppresses activation of hepatic stellate cells in vitro. *Int J Biochem Cell Biol* 42: 948-57, 2010.

Yu JG, Javorschi S, Hevener AL, Kruszynska YT, Norman RA, Sinha M, Olefsky JM. The effect of thiazolidinediones on plasma adiponectin levels in normal, obese, and type 2 diabetic subjects. *Diabetes* 51: 2968-74, 2002.

Yu S, Matsusue K, Kashireddy P, Cao WQ, Yeldandi V, Yeldandi AV, Rao MS, Gonzalez FJ, Reddy JK. Adipocyte-specific gene expression and adipogenic steatosis in the mouse liver due to peroxisome proliferator-activated receptor gamma1 (PPARgamma1) overexpression. *J Biol Chem* 278: 498-505, 2003.

Zhan YT, An W. Roles of liver innate immune cells in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 16: 4652-60, 2010.

Zhang H, Zhang A, Kohan DE, Nelson RD, Gonzalez FJ, Yang T. Collecting duct-specific deletion of peroxisome proliferator-activated receptor gamma blocks thiazolidinedione-induced fluid retention. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 9406-11, 2005.

Zhang J, Fu M, Cui T, Xiong C, Xu K, Zhong W, Xiao Y, Floyd D, Liang J, Li E, Song Q, Chen YE. Selective disruption of PPARgamma 2 impairs the development of adipose tissue and insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 10703-8, 2004.

Zhang YL, Hernandez-Ono A, Siri P, Weisberg S, Conlon D, Graham MJ, Crooke RM, Huang LS, Ginsberg HN. Aberrant hepatic expression of PPARgamma2 stimulates hepatic lipogenesis in a mouse model of obesity, insulin resistance, dyslipidemia, and hepatic steatosis. *J Biol Chem* 281: 37603-15, 2006.

Zhao X, Strong R, Zhang J, Sun G, Tsien JZ, Cui Z, Grotta JC, Aronowski J. Neuronal PPARgamma deficiency increases susceptibility to brain damage after cerebral ischemia. *J Neurosci* 29: 6186-95, 2009.

Zhu Y, Alvares K, Huang Q, Rao MS, Reddy JK. Cloning of a new member of the peroxisome proliferator-activated receptor gene family from mouse liver. *J Biol Chem* 268: 26817-20, 1993.

Zhu Y, Qi C, Korenberg JR, Chen XN, Noya D, Rao MS, Reddy JK. Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 7921-5, 1995.



## **ANEXO I: Figuras Adicionales del Artículo 2**

---



**Figura I:** La ausencia de PPAR $\gamma$  en los hepatocitos promueve una respuesta leve frente a LPS en los cultivos organotípicos. Evaluación de la inflamación en cultivos organotípicos de hígado de ratones CT (n=3) y Alb-Cre (n=4). ALT, LDH y la expresión génica de COX-2, TNF- $\alpha$ , IL-6 y MCP-1 fueron determinadas en cultivos organotípicos de hígado incubados con LPS (100  $\mu$ g/ml) durante 18h. Los resultados corresponden a 3 experimentos independientes por triplicado. Los resultados están expresados como incremento de expresión en relación al vehículo como media  $\pm$  SEM. \*, P<0.05 respecto ratones CT.

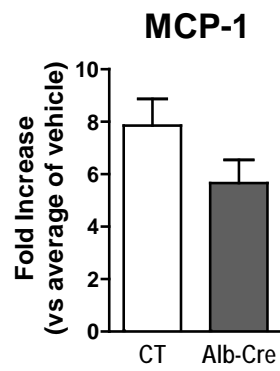
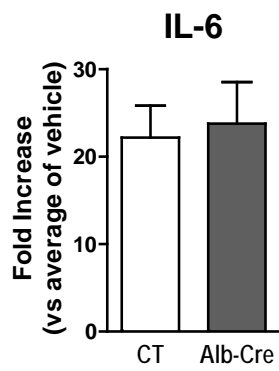
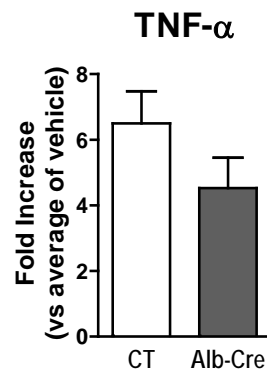
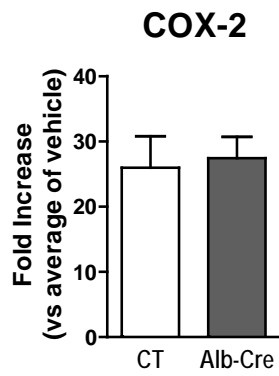
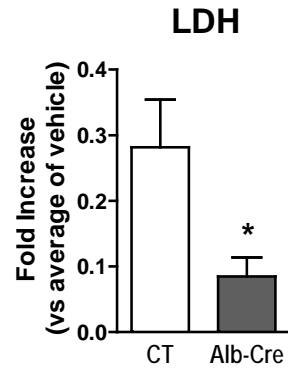
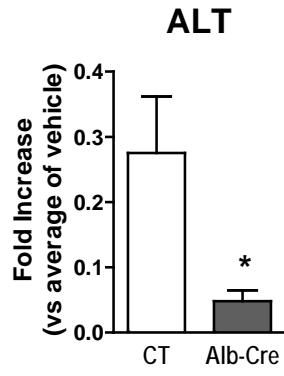
**Figura II:** La delección específica de PPAR $\gamma$  en los hepatocitos no afecta el daño hepático frente a daño agudo por CCl $_4$ . Ratones CT (n=8) y Alb-Cre (n=4) fueron sometidos a una única dosis de CCl $_4$  (0.5 ml/kg p.c.) y después de 24 h, los niveles de ALT y AST, y los marcadores proinflamatorios COX-2, TNF- $\alpha$ , IL-6 and MCP-1 fueron determinados. Los resultados están expresados como media  $\pm$  SEM. \*, P<0.05 respecto ratones CT.

**Figura III:** Genotipo, fenotipo y efectos en la inflamación hepática en ratones KO condicionales de PPAR $\gamma$ . **(A)** Representación esquemática del gen de PPAR $\gamma$  homocigoto ( $\gamma^{f/f}$ ) y heterocigoto ( $\gamma^{f/-}$ ) floxeado. **(B)** Constructos de la recombinasa Cre controlados por el promotor de la albúmina ( $\Delta$ hep), lisozima-M ( $\Delta$ mac) y aP2 ( $\Delta$ hsc). Análisis por PCR de la expresión genómica de los constructos en el ADN procedente del hígado de los ratones control CT $^{f/f}$  (línea 1) y CT $^{f/-}$  (línea 3) y KO condicionales  $\gamma^{f/f}$  y  $\gamma^{f/-}$  (líneas 2 y 4). Marcador de peso molecular de ADN fue utilizado como un marcador de tamaño estándar (M). **(C)** Microfotografías representativas de tinciones con hematoxilina-eosina de hígado de ratones de secciones de hígado de ratones control (CT) homocigotos ( $\gamma^{f/f}$ ) (f/f, n= 8) y heterocigotos ( $\gamma^{f/-}$ ) (f/-, n= 8) floxeados en PPAR $\gamma$  y ratones KO condicionales de PPAR $\gamma$  en hepatocito ( $\Delta$ hep (n=14)) y macrófago ( $\Delta$ mac (n=17)) sometidos al modelo crónico de daño hepático por CCl $_4$  (magnificación x200 y x400 (recuadro) barra de escala: 100  $\mu$ m y 50  $\mu$ m, respectivamente). **(D)** Niveles séricos de AST en ratones f/f y f/- CT,  $\Delta$ hep y  $\Delta$ mac.

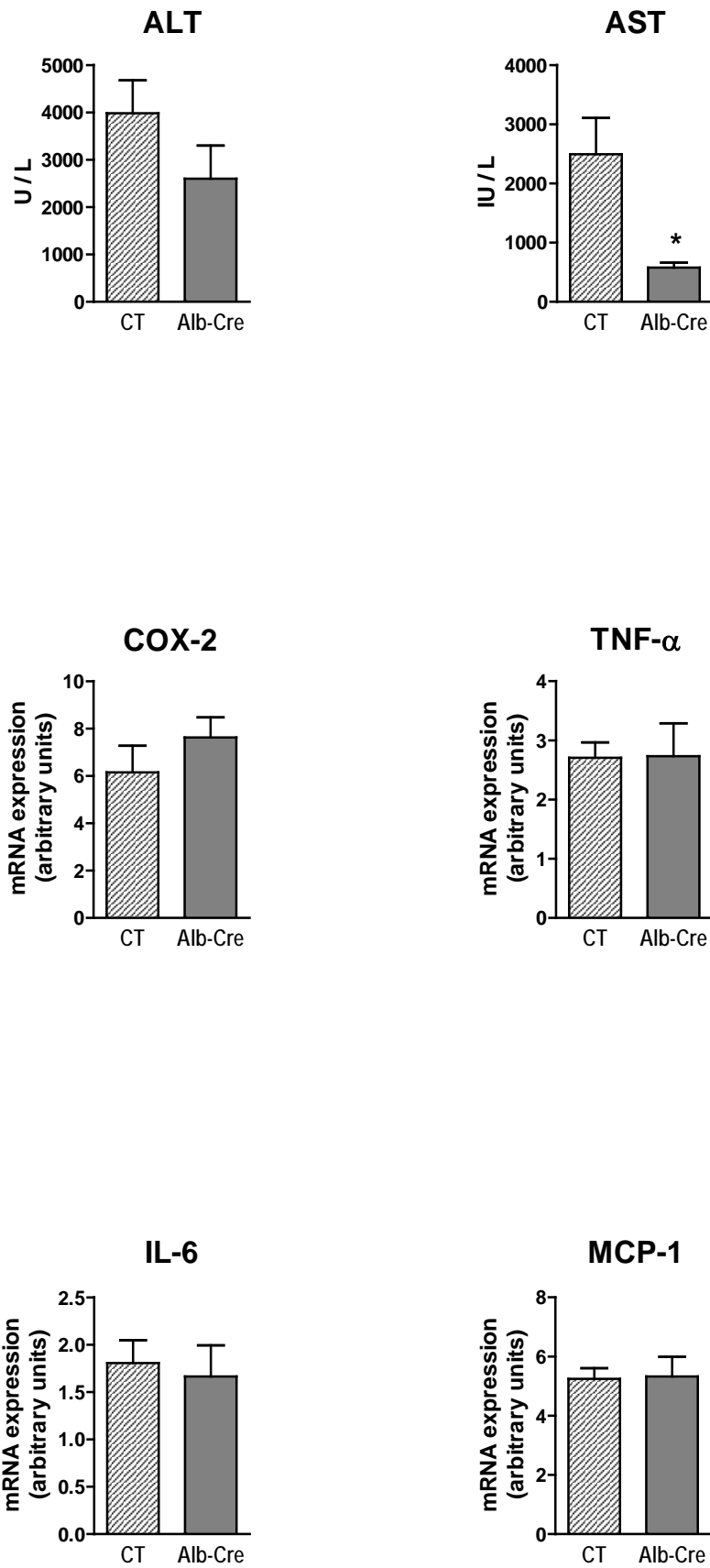
**Figura IV:** Daño hepático inflamatorio en ratones homocigotos floxeados en PPAR $\gamma$  sometidos al modelo crónico de daño hepático por CCl $_4$ . Expresión hepática de genes proinflamatorios COX-2, TNF- $\alpha$ , CXCL-2, IL-6 y MCP-1, y microfotografías representativas de tinciones hepáticas con el marcador específico de macrófago F4/80 en secciones de hígado de ratones CT $^{f/f}$  (n=8),  $\gamma^{f/f}$   $\Delta$ hep (n=6) y  $\gamma^{f/f}$   $\Delta$ mac (n=8) (magnificación x200, barra de escala: 100  $\mu$ m). Análisis histomorfométrico

representado como porcentaje de área teñida (%). Los resultados están expresados como media  $\pm$  SEM. \*, P<0.05 y \*\*, P<0.001 respecto ratones CT<sup>f/f</sup>.

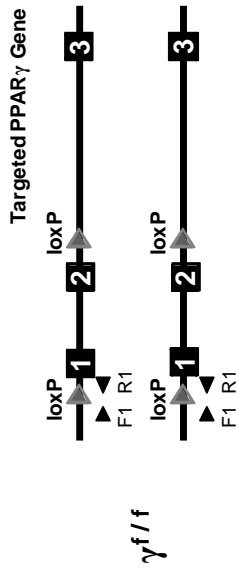
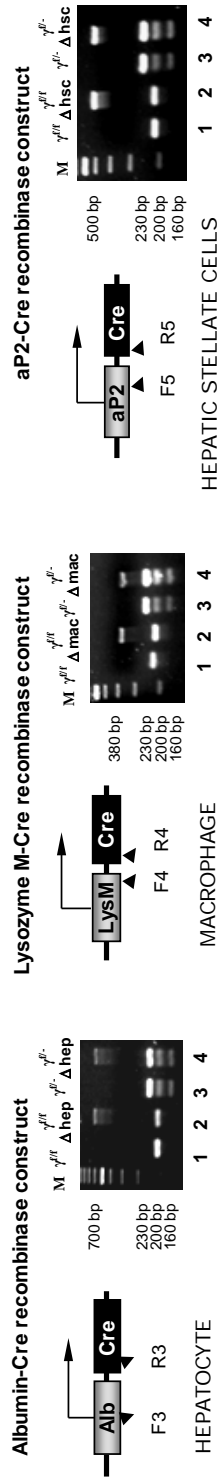
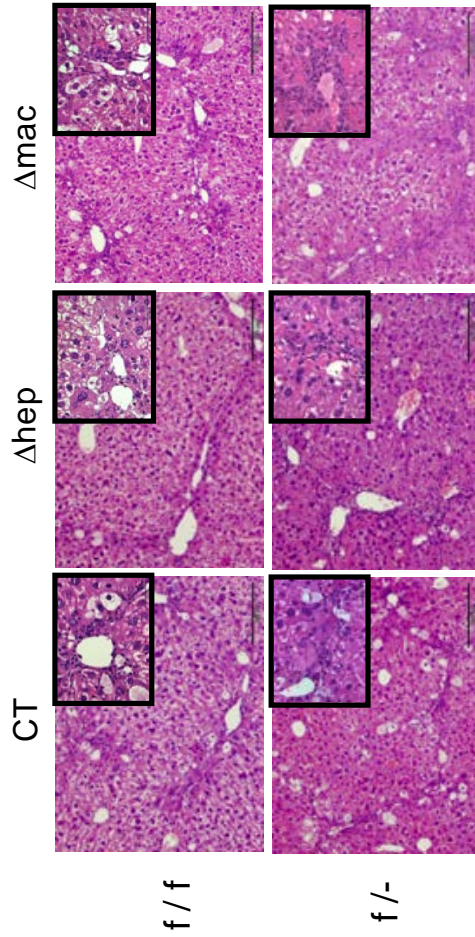
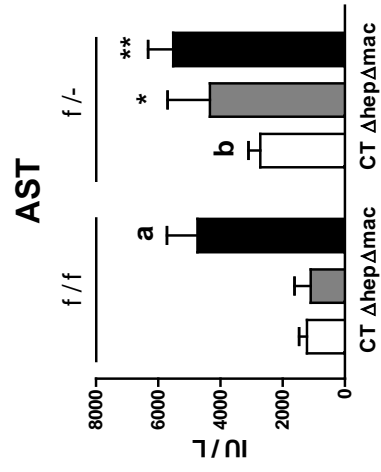
**Figura V:** Respuesta fibrogénica en ratones homocigotos floxeados en PPAR $\gamma$  sometidos al modelo crónico de daño hepático por CCl<sub>4</sub>. Microfotografías representativas, análisis histomorfométrico de secciones de hígado teñidas con Sirius Red, y expresión hepática de genes profibrogénicos  $\alpha$ -SMA, TIMP-1, MMP-2 and TGF- $\beta$  de ratones CT<sup>f/f</sup> (n=8),  $\gamma^{f/f}$   $\Delta$ hep (n=6),  $\gamma^{f/f}$   $\Delta$ mac (n=8) y  $\gamma^{f/f}$   $\Delta$ hsc (n=5) (magnificación x40, barra de escala: 500  $\mu$ m). Los resultados están expresados como media  $\pm$  SEM. \*, P<0.05 \*\*, P<0.01 y \*\*\*, P<0.001 respecto ratones CT<sup>f/f</sup>.



**Figura I**



**Figura II**

**A****B****C****D****Figura III**

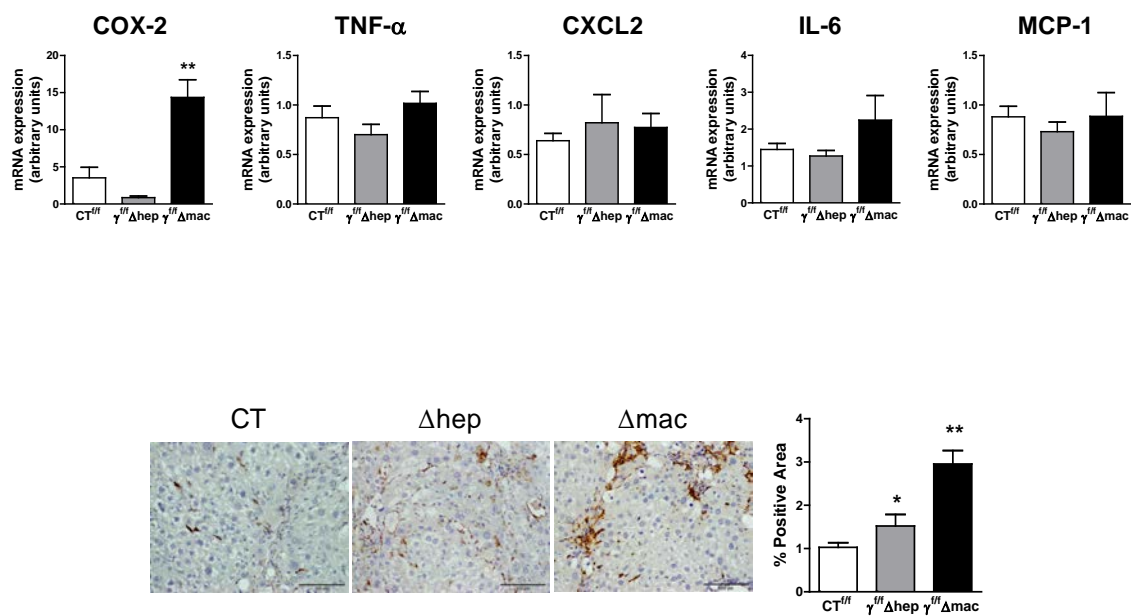


Figura IV

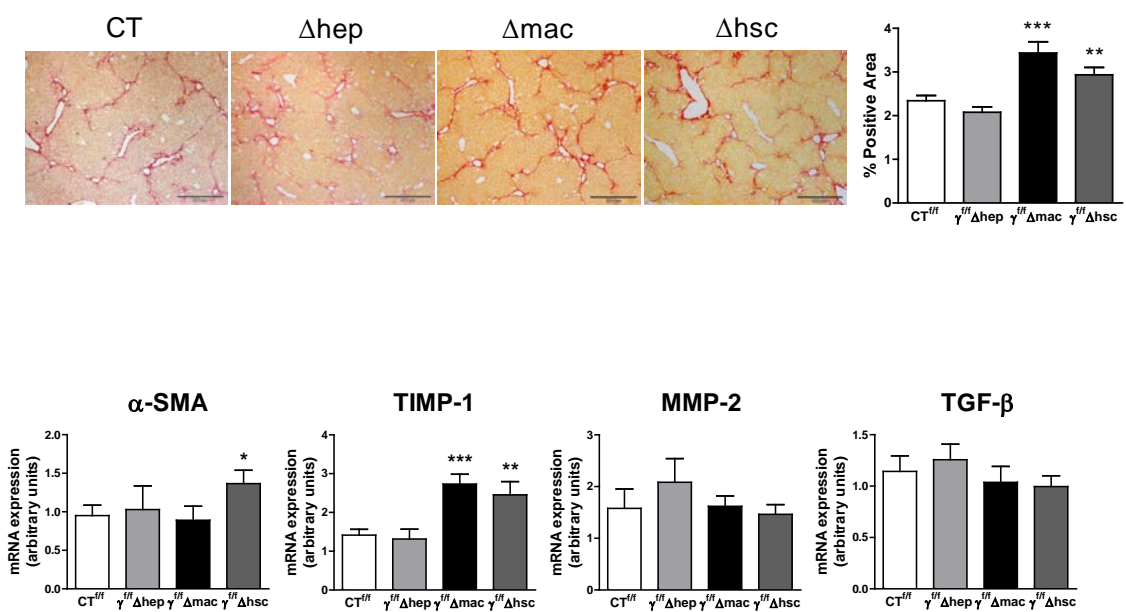


Figura V



## **ANEXO II: Material y Métodos**

---



## 1- Ratones KO de PPAR $\gamma$ condicionales de célula

Los ratones se alojaron en el animalario de la Universidad de Barcelona en jaulas con virutas de serrín, el nivel de humedad fue 50-60% y los ciclos de luz-oscuridad fueron cada 12 horas. Durante el apareamiento y período de crecimiento fueron alimentados con una dieta comercial con alto contenido proteico y suplementos vitamínicos diseñada para el mantenimiento, gestación y crecimiento de colonias (6.2% de grasa y 18% Kcal de la grasa, con 18.6% contenido de proteína cruda, #2018S, Teklad Diets, Madison, WI). Las tres colonias de ratones KO condicionales de PPAR $\gamma$  se alimentaron con esta dieta hasta el momento que cumplían la edad deseada para ser incluidos en un modelo de estudio (ver apartado II.1, II.2 y II.3).

### 1.1- Ratones modificados genéticamente

Hemos utilizado la tecnología Cre-LoxP para generar modelos genéticos en los que se ha eliminado selectivamente el gen para PPAR $\gamma$  de forma específica en hepatocito (utilizando el promotor de Albúmina para expresar la recombinasa Cre), en macrófago y célula de Kuffer (LysM-Cre, el promotor de la línea mieloide es la lisozima M) o en célula estrellada hepática (aP2-Cre, utilizamos el promotor del gen aP2 o FABP4 expresada por las CEH durante el fenotipo de quiescencia) (Barak Y et al, Mol Cell 1999; Postic C et al, JBC 1999; Clausen BE et al, Transgenic Res 1999; He W et al, PNAS 2003). A partir de la establecida estrategia de cruce de las parejas reproductoras (PPAR $\gamma^{f/f}$  x PPAR $\gamma^{f/-}$  Cre o PPAR $\gamma^{f/-}$  x PPAR $\gamma^{f/f}$  Cre), se generaron cuatro genotipos en cada una de las colonias: control homocigoto floxeado en el gen de PPAR $\gamma$  (PPAR $\gamma^{f/f}$ , CT $^{f/f}$ ), control heterocigoto floxeado en PPAR $\gamma$  haploinsuficiente en el resto de células ya que presentan un alelo floxedo y el otro invalidado (PPAR $\gamma^{f/-}$ , CT $^{f/-}$ ), ratones homocigotos KO condicionales específicos de célula (PPAR $\gamma^{f/f}$  promotor-Cre,  $\gamma^{f/f}$   $\Delta$ cel) y ratones heterocigotos KO condicionales específicos de célula (PPAR $\gamma^{f/f}$  promotor-Cre,  $\gamma^{f/-}$   $\Delta$ cel).

La identificación del genotipo de las crías generadas en cada una de las colonias se realiza a partir de la extracción de ADN genómico de tejido de la cola o la oreja del ratón. A partir de los 21 días de vida se puede destetar la camada, separar en dos jaulas las hembras de los machos y marcar cada ratón siguiendo un código de identificación. En el mismo momento se recoge el tejido extraído con tijeras o utilizando un marcador (Finger Loop Ear Punch- 2.0mm, Fine Science Tools) para obtener el ADN genómico. Seguidamente se realiza una PCR convencional utilizando cebadores específicos para el constructo introducido en el gen de PPAR $\gamma$  y cada tipo de transgénico expresando la enzima Cre. Los animales utilizados en los estudios experimentales de la presente tesis corresponden a la generación obtenida en un segundo cruce (F2) y las

posteriores.

### 1.2- Extracción de ADN genómico de tejido

El ADN genómico fue aislado y purificado de pequeñas porciones de cola de ratón o de tejido obtenido durante el marcaje en las orejas. El tejido de cola u oreja de ratón se pesa y trocea con un bisturí antes guardarlo a -20°C hasta el momento de procesarlo. La extracción se realizó utilizando el kit Omni-Pure™ Tissue Genomic DNA Purification System (Gene Link, NY, USA), siguiendo protocolo del fabricante con pequeñas variaciones.

### 1.3- Genotipado por PCR convencional

Los ratones KO condicionales para el gen de PPAR $\gamma$  fueron genotipados por PCR convencional utilizando una multiplex de tres pares de cebadores específicos que requieren unas condiciones determinadas de concentración entre los cebadores y T<sup>a</sup> de unión al ADN (ver Tabla 1).

Gen	Secuencia de los cebadores	Multiplex (pmol/ $\mu$ l)	Tamaño (pb)	Fluorocromo
Floxed PPAR $\gamma$ (S1)	5'-CTAGTGAAGTATACTATACTGTGCAGCC	7	160/200	FAM
Floxed PPAR $\gamma$ (A1)	5'-GTGCATAATAAACATGGGAGCATAGAAGC	6,9		
PPAR $\gamma$ (S2)	5'-AGGCCACCATGGAAAGCCACAGTTCCTC	5	230	HEX
LacZ (A2)	5'-GCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAG	2,5	700	NED
Alb-Cre (S3)	5'-GCTCCAGATGGCAAACATACGCAAGG	4		
Cre (A3)	5'-GAACGCTAGAGCCTGTTTTGCACGTTC	4	380	NED
LysM-Cre (S4)	5'-GCATTACCGGTTCGATGCAACGAGTG	4		
Cre (A4)	5'-GAACGCTAGAGCCTGTTTTGCACGTTC	4	600	NED
aP2-Cre (S5)	5'-GAGCTATCTGGACTTCAGAGGCTC	15		
Cre (A5)	5'-GAACGCTAGAGCCTGTTTTGCACGTTC	4		

**Tabla Suplementaria 1.** Secuencias, concentración final en la multiplex y tamaño aproximado de los productos para los cebadores de PCR utilizados en el genotipado. Abreviaciones: pb, pares de bases; S, sentido; A, antisentido

La PCR de genotipado se realiza en un volumen total de 20  $\mu$ l que contiene 1  $\mu$ l de ADN procedente de tejido de la cola o de la oreja del ratón, 1  $\mu$ l de la multiplex de primers, 10  $\mu$ l de agua, 8  $\mu$ l de MasterMix de 5PRIME (5 PRIME GmbH, Hamburg, Alemania). En el segundo estudio se utilizó una Taq polimerasa más específica para la amplificación de varios locus de ADN al mismo tiempo, manteniendo las cantidades de cebadores y ADN se modificó los reactivos en la reacción: 2  $\mu$ l 10x buffer (2.5 mM MgCl<sub>2</sub>), 3.2  $\mu$ l DNTPs (1.25 mM), and 0.1  $\mu$ l 5 PRIME HotMaster Taq DNA Polymerase (0.5 U) (5 PRIME GmbH, Hamburg, Germany). La reacción de PCR consistió en una primera desnaturalización del ADN genómico durante 2min a 94°C, seguidos de 40 ciclos de amplificación de 94°C (20 segundos), 60°C (45 segundos) y 71.5°C (1 minuto 30 segundos). Los

productos de la PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa “LM Sieve” (Laboratorios Conda, Madrid, España) al 2.5% y visualizados en un transiluminador UV mediante la tinción con bromuro de etidio o GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Hayward, CA), utilizando como marcador de peso molecular el 100-bp DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA).

#### **1.4- Genotipado por Análisis de fragmentos**

Alternativamente la PCR de genotipado también fue realizada en las mismas condiciones anteriormente descritas pero utilizando cebadores marcados con fluorescencia (descrito en la Tabla suplementaria 1). Los productos de la PCR fueron analizados por electroforesis capilar en el Analizador Genético 3130 (Applied Biosystems).

## **2- Estudios *in vivo***

Todos los estudios realizados en animales se llevaron a cabo de acuerdo 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.

Para estudiar la EHGNA, en concreto los dos estadios más representativos de la patología como es la esteatosis y la fibrosis hepática, los ratones se sometieron a dos modelos experimentales de daño hepático.

### **2.1- Modelo experimental de inducción de obesidad y esteatosis hepática con DRG**

El modelo experimental de obesidad para provocar el estadio de esteatosis hepática de la EHGNA, los ratones fueron alimentados con una dieta rica en grasa a partir de 8ª semana de edad durante 12 semanas. Los ratones fueron pesados semanalmente, y el consumo de dieta fue medido dos veces por semana cuando se sustituía por dieta nueva. La dieta rica en grasa contiene un 33.8% de grasa y el 60% de las Kcal proceden de grasa (Harlan Teklad) cantidad muy superior a la dieta estándar de ratón utilizada como control (7.2% de grasa y 11% Kcal procedentes de la grasa). La DRG se compró irradiada y en paquetes de 1kg que se guardaron a -20°C, una vez abierta se guardaba a 4°C y se atemperaba antes de suministrarla dos veces en semana, estas medidas se tomaron para evitar la oxidación de los AG.

### **2.2- Modelo crónico experimental de daño hepático con CCl<sub>4</sub>**

Para inducir el estado inflamatorio y el desarrollo de fibrosis hepática, se provocó el daño hepático a través de la administración del compuesto hepatotóxico tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>)

(Clària J et al, **Ascites and Renal Dysfunction in Liver Disease 1999**) con modificaciones. Los animales recibieron inyecciones intraperitoneales (i.p.) de CCl<sub>4</sub> a una dosis de 1ml/kg de peso corporal diluido en aceite de oliva (1/8) (Sigma), 2 veces por semana durante 8 semanas.

### **2.3- Modelo agudo experimental de daño hepático con CCl<sub>4</sub>**

Para producir una respuesta inflamatoria frente a un daño agudo en el hígado se sometió a los ratones a una única administración i.p. de CCl<sub>4</sub> (0.5 ml/kg de peso corporal) diluido en aceite de oliva (1/16) (Sigma). Los ratones se sacrificaron transcurridas 24 horas desde el tratamiento.

### **2.4- Test de tolerancia a la glucosa (TTG)**

Este método se realizó a los grupos experimentales del primer estudio de la tesis. Los ratones sometidos al modelo experimental de inducción de esteatosis hepática con DRG y sus respectivos controles alimentados con una dieta estándar fueron ayunados durante 6 horas en una nueva jaula sin restos de comida. Los ratones recibieron una inyección i.p. de glucosa (2 g glucosa/kg peso corporal, en una solución al 20% en suero fisiológico). Las muestras de sangre de la cola de ratón se obtuvieron en el momento anterior a la administración de la glucosa y a los 5, 15, 22.5, 30, 45, 60 y 90 minutos, y se determinó el nivel de glucosa circulante mediante tiras de glucosa con el sistema Accu-Chek® Aviva (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland).

### **2.5- Test de tolerancia a la insulina (TTI)**

Se realizó el test de tolerancia a la insulina a los ratones que formaron parte del primer estudio. Los ratones fueron ayunados durante 2 horas y posteriormente recibieron una inyección i.p. de insulina recombinante (0.75 U de insulina/kg peso corporal, Sigma Aldrich). Se tomaron muestras de sangre de la cola en el momento antes de la administración de la insulina y transcurridos 5, 15, 30, 45 y 60 minutos.

### **2.6- Sacrificio de los ratones**

Los ratones utilizados en los dos estudios realizados se sacrificaron a las 20 y entre las 12-14 semanas de edad tras finalizar los modelos experimentales crónico y agudo, respectivamente. Los sacrificios de los ratones de estudio se realizaron en periodos diferentes debido a la inclusión de camadas diversas en un mismo grupo de estudio.

Una vez los ratones fueron anestesiados con una mezcla de ketamina/xilacina (4:1, 0.1 mg ketamina/g peso corporal y 0.01 mg xilacina/g peso corporal) (Ketolar®, Parke Davis-Pfizer, Dublin, Ireland y Rompun®, Bayer, Leverkusen, Germany), se recogieron las muestras de sangre

por punción cardíaca, muestras de hígado, tejido adiposo y músculo esquelético. Una porción de hígado y de tejido adiposo se limpió en *Dulbecco's phosphate buffered saline* (DPBS), se fijó en 10% formalina en tubos de 15ml máximo 24h seguidamente se transfieren en tubos de 15ml con 30% etanol, y posteriormente inician el protocolo de parafinado en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínic. Otra porción de tejido hepático fue recubierto en *optical cutting temperature* (OCT) (Sakura Finetek, Tokyo, Japan) y sumergido en isopentano enfriado con hielo seco y se guardó a -80°C. El resto de las muestras se sumergieron en nitrógeno líquido y se guardaron en criotubos a -80°C para la realización de análisis posteriores.

### 2.7- Análisis bioquímico

Las muestras de sangre total se centrifugaron a 3,000 g durante 10 minutos para la obtención del suero. La concentración sanguínea de colesterol, triglicéridos y glucosa, así como la determinación de la actividad de alanina aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) y LDH fueron determinadas mediante procedimientos estándar de laboratorio en el CORE del Hospital Clínic de Barcelona. Los niveles sanguíneos de insulina y de ácidos grasos libres (AGL) fueron determinados utilizando los kits “Ultrasensitive Mouse Insulin ELISA Kit” (Merckodia, Uppsala, Sweden) y “HR Series NEFA-HR (2) Kit” (Wako Chemicals, Richmond, VA, USA), respectivamente.

### 2.8- Determinación de AMP cíclico

Adenosín 3',5' monofosfato cíclico (AMPc) es un mensajero secundario sintetizado a partir del ATP por la enzima adenilato ciclase la cual está localizada en la membrana celular. Al ser un segundo mensajero, el AMPc responde a estímulos externos o internos como la glucosa o la adrenalina, participando en rutas de traducción de señal como la activación de proteína quinasas variadas.

1- Se homogenea una porción de hígado en 5 volúmenes de ácido tricloroacético 5% (TCA) (ml solución/mg tejido, en concreto aproximadamente 50 mg en 500 µl) para purificar las muestras de fosfodiesterasas e inmunoglobulinas.

2- Centrifugar los homogenados durante 10 min a 1500g 4°C. Se transfieren el sobrenadante a tubos de vidrio.

El TCA se extrae del sobrenadante de las muestras utilizando H<sub>2</sub>O saturada de éter (Sigma):

*Preparar H<sub>2</sub>O saturada de éter en un vaso de precipitados añadiendo agua al éter hasta que se formen dos capas (5ml H<sub>2</sub>O en 50ml éter), mezclar y utilizar la capa superior que corresponde al éter saturado.*

3- Añadir 5 volúmenes de éter saturado a 1 volumen de sobrenadante, poner parafilm y mezclar

cuidadosamente golpeando la base del tubo. La fase acuosa se separa de la fase orgánica, se descarta la fase superior (orgánica) y se repite la extracción 2 veces más.

4- Las muestras se colocan en una estufa a 70°C durante unos minutos para eliminar los residuos de éter de la fase acuosa (sobretudo evitar que queden trazas porque pueden interferir en el ensayo). Las muestras se guardan a 4°C para iniciar la determinación de AMPc el día siguiente.

5- La curva estándar (0.08-10 pmol/ml) se prepara con la misma matriz que las muestras para poder determinar el AMPc directamente de las muestras. Guardar a 4°C hasta determinación.

*Preparación de la solución matriz: extraer 20 ml de TCA 5% en éter saturado explicado en el punto 3 y 4.*

7- Las muestras se diluyen 1/100 en solución matriz TCA 5%-éter saturado (V final= 500 $\mu$ l)

6- Acetilar las muestras y la curva estándar individualmente controlando el tiempo de reacción.

Añadir a 500 $\mu$ l de muestra/estándar:

- 100  $\mu$ L KoH 4M y 25  $\mu$ l de anhídrido acético
- Vortex 15 segundos
- Parar reacción con 25  $\mu$ l de KoH 4M

7- Se cuantifica el AMPc utilizando una prueba ELISA de tipo competitivo (Cyclic AMP EIA kit, #581001 Cayman Chemical)

### **3- Estudios histológicos**

Las tinciones histológicas se realizaron en muestras de hígado procedentes de los ratones sometidos a los diferentes estudios *in vivo* realizados. Las muestras fueron obtenidas en el momento del sacrificio, fueron lavadas en DPBS, incluidas en parafina u OCT y posteriormente cortadas en micrótomos o criótomos respectivamente por personal del servicio de anatomía patológica del Hospital Clínic de Barcelona. Así mismo las tinciones Sirius Red y el tricómico de Masson para determinar el contenido de colágeno en tejido fueron realizadas por el servicio de anatomía patológica. Las técnicas histológicas se realizaron en cámaras húmedas y los lavados en cubetas *copplin*.

#### **3.1- Determinación de la inflamación hepática por H&E**

Cortes de 5  $\mu$ m de muestras de hígado envueltas en parafina fueron teñidas con hematoxilina-eosina en el servicio de patología del Hospital Clínic de Barcelona. La cuantificación de inflamación lobular así como la determinación del grado de daño y muerte celular hepática fue realizada a ciegas por la hepatóloga registrada Rosa Miquel del Hospital Clínic de Barcelona. El grado inflamatorio fue expresado como el número de focos inflamatorios por campo, tras el conteo de



una media de 15 campos por corte a un aumento de X200.

### **3.2- Determinación de la esteatosis hepática por tinción con Oil Red-O**

Para la realización de esta técnica se obtuvieron criocortes de 5 µm de hígado incluido en OCT. La esteatosis hepática se realizó mediante la tinción de Oil Red-O según el protocolo que se detalla a continuación:

- 1- Fijar con isopropanol al 60% durante 10 minutos.
- 2- Teñir con Oil Red-O al 0,3% en isopropanol al 60% durante 30 minutos.
- 3- Lavar las muestras con isopropanol (60%).
- 4- Contrateñir con hematoxilina de Gill durante 1 minuto y lavar con agua corriente.
- 5- Lavar las muestras con una solución de ácido acético al 4%.
- 6- Montar con solución acuosa y secar.

Los cortes teñidos fueron visualizados en un microscopio Nikon Eclipse E600 (Kawasaki, Kanagawa, Japón) a un aumento de X200. La cuantificación de la esteatosis hepática se realizó mediante un sistema informatizado de análisis de imagen AnalySIS® (Soft Imaging System, Múnich, Alemania) y se expresó como el porcentaje de área teñida con Oil Red-O. Un mínimo de 10 campos independientes fueron analizados.

### **3.3- Determinación de la fibrosis hepática por tinción con Sirius Red y tricrómico de Masson**

Para determinar el grado de fibra extracelular depositada en la parénquima hepática se realizó la tinción con Sirius Red así como la tinción tricrómica de Masson de secciones de 5 µm de hígado preservado en parafina. Las tinciones fueron realizadas por el servicio de anatomía patológica del Hospital Clínic de Barcelona. El protocolo de la tinción de Sirius Red se detalla a continuación:

- 1- Desparafinar e hidratar los cortes con la secuencia 10 minutos en xileno (1), 5 minutos en xileno (2), 5 minutos en etanol 100% (1), 5 minutos en etanol 100% (2), 5 minutos en etanol 70% (1), 5 minutos en etanol 70% (2), 5 minutos en etanol 50% y 5 minutos en H<sub>2</sub>O.
- 2- Incubar con tiosemicarbazida 0.5% durante 10 minutos.
- 3- Teñir con la solución de Sirius Red (0.1% de Sirius Red F3B en una solución saturada de ácido pícrico) durante 1 hora.
- 4- Lavar con una solución de ácido acético 0.5%.
- 5- Deshidratar rápidamente con etanol 70%, etanol 100% y xileno.
- 6- Montar con cubreobjetos y medio no acuoso (DPX).

Los cortes fueron visualizados en un microscopio Nikon Eclipse E600 (Kawasaki, Kanagawa, Japón)

a un aumento de X40 y x100 para Sirius Red y tricrómico de Masson, respectivamente. El área relativa de fibrosis se expresó como el porcentaje de área teñida con Sirius Red a partir de la cuantificación por histomorfometría realizada mediante el *software* de análisis de imagen Image J (Macbiophotonics, McMaster University; Hamilton, ON, Canada). Un mínimo de 5 campos independientes fueron analizados.

### 3.4- Detección de macrófagos positivos F4/80 por inmunohistoquímica

F4/80 es un marcador específico del receptor de membrana de macrófagos murinos. Para la detección del infiltrado inflamatorio de macrófagos, se obtuvieron cortes de 5  $\mu$ m de hígado incluido en parafina y se secaron durante un día a 37°C. *Recomendación: Se debe evitar que las secciones se puedan secar en alguno de los pasos y durante las incubaciones largas se debe poner porciones de parafilm para evitar la evaporación de los anticuerpos.*

#### Reactivos

<b>Tripsina 0.1%</b> (-20°C alícuotas) 10 mg tripsina 10 mL H <sub>2</sub> O milli Q	<b>PBS-1X</b> 500mL : 50 mL PBS 10x (Roche Diagnostics) 450 mL H <sub>2</sub> O milli Q
<b>Cloruro de calcio 1%</b> (4º) 0.1 g CaCl <sub>2</sub> 10 mL H <sub>2</sub> O milli Q Ajustar <b>pH =7.3 – 7.4</b> Guardar alícuotas a -20°C	<b>Tripsina: Solución de trabajo</b> 0.5 mL tripsina 0.1% (sera 0.05% final) 0.1 mL calcium chloride 1% (sera 0.1% final) 0.4 mL H <sub>2</sub> O milli Q Guardar alícuotas a -20°C

- **Anticuerpo primario: Rat anti-Mouse F4/80 (MCAP497, Serotec, Oxford, UK)**
- **Líquido DAB (diaminobenzidine) y la solución de sustrato o cromógeno (K3468, Dako).**
- **Vectastain ABC Detection System with Secondary Biotinylated Rabbit anti-Rat IgG (PK4004, Vector Laboratories, Burlingame, CA)**

#### Protocolo

- 1- Desparafinar e hidratar los cortes con la secuencia 10 minutos en xileno (1), 5 minutos en xileno (2), 5 minutos en etanol 100% (1), 5 minutos en etanol 100% (2), 5 minutos en etanol 70% (1), 5 minutos en etanol 70% (2), 5 minutos en etanol 50% y 5 minutos en H<sub>2</sub>O.
- 2- Delimitar con un lápiz hidrofóbico el área de incubación alrededor del corte.
- 3- Desenmascarar el antígeno con 0,05% tripsina/0,1% CaCl<sub>2</sub> (0.1%) durante 20 minutos a 37°C y atemperar a Tª ambiente durante 10 minutos.
- 4- Lavar con PBS 1X, dos veces durante 2 minutos.

- 5- Bloquear la peroxidasa endógena con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.3% (Peroxidase-Blocking Solution S2023, Dako), durante 25 minutos a T<sup>a</sup> ambiente y protegido de la luz.
- 6- Lavar como en el paso 4.
- 7- Incubar con suero de bloqueo (BSA 2%) durante 20 minutos para evitar uniones inespecíficas (*corresponde al reactivo número 1 del kit Vectastain® ABC*).
- 8- Incubar con el anticuerpo anti-F4/80 durante toda la noche a 4°C. En los controles negativos añadir PBS 1X sin anticuerpo.
- 9- Lavar como en el paso 4.
- 10- Incubar durante 30 minutos a T<sup>a</sup> ambiente con el anticuerpo secundario biotinizado de conejo contra la IgG de rata (*reactivo 2 del kit Vectastain® ABC*). Preparar el reactivo 3 (A+B) del kit Vectastain® ABC y atemperarlo durante 30 minutos a T<sup>a</sup> ambiente.
- 11- Lavar como en el paso 4.
- 12- Incubar las secciones con el complejo ABC durante 30 minutos a T<sup>a</sup> ambiente (*reactivo 3 preparado anteriormente*).
- 13- Lavar como en el paso 4.
- 14- Revelar el color con DAB (*1 gota de DAB/ml de cromógeno*), controlar la aparición de color en el microscopio y parar la reacción en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>.
- 15- Contrateñir con hematoxilina-eosina durante 1 minuto y lavar con agua corriente hasta el viraje del color.
- 16- Lavar con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> y deshidratar (proceso inverso al de hidratar).
- 17- Montar con medio no acuoso (DPX) y secar.
- 18- Los cortes fueron visualizados en un microscopio Nikon Eclipse E600 (Kawasaki, Kanagawa, Japón) a un aumento de X200 y la cuantificación de la tinción por F4/80 se realizó mediante un sistema informatizado de análisis de imagen Imaging Software Cell\* (Olympus Soft Imaging Solution GmbH, Múnich, Alemania), y se expresó como el porcentaje de área teñida con F4/80. Un mínimo de 15 campos independientes fueron analizados.

## **4- Estudios *in vitro***

### **4.1- Aislamiento y cultivo primario de hepatocitos**

El aislamiento de hepatocitos de ratón se llevo a cabo utilizando la técnica de perfusión *in situ* de colagenasa, protocolo puesto a punto durante la tesis del Dr. Marcos Martínez. Los ratones utilizados en los aislamientos se encontraban en edad adulta (a partir de las 20 semanas de edad).

Medio (tiempo de perfusión)	Composición
<b>Cultivo de hepatocitos</b>	Williams'E suplementado con:
	10% FBS, 2 mM L-glutamina, 50 IU/mL of penicilina, 50 $\mu$ g/mL estreptomycin, 1 $\mu$ M insulina, 15 mM HEPES y 50 $\mu$ M $\beta$ -mercaptoetanol; <b>pH= 7.4</b>
<b>Perfusión 1 (3 min)</b>	HBSS sin calcio ni magnesio (HBSS <sup>-</sup> ) complementado con:
	0.5 mM EDTA; <b>pH=7.4</b>
<b>Perfusión 2 (2min)</b>	HBSS sin calcio ni magnesio (HBSS <sup>-</sup> ) complementado con:
	10 mM de HEPES; <b>pH=7.4</b>
<b>Perfusión 3 (2-4min)</b>	HBSS sin calcio ni magnesio (HBSS <sup>-</sup> ) complementado con:
	5 mM de CaCl <sub>2</sub> , 10 mM de HEPES y 0.03% de colagenasa tipo IV (179.4 U/mL, Sigma); <b>pH=7.4</b>
<b>Contaje celular</b>	10 $\mu$ l de solución celular diluidos en:
	90 $\mu$ l de <i>Tripan Blue</i> , 100 $\beta$ l de tampón de contaje (0.5% ácido acético en salino) (Nº células/4) x 20 x 10 <sup>4</sup> = células/ml

**Tabla Suplementaria 2.** Medios de cultivo, perfusión y contaje en el aislamiento de hepatocitos de hígado de ratón

Notas:

- I) Los medios de perfusión se preparan el día anterior al aislamiento. En el caso del medio de perfusión 3, la colagenasa se añade antes de empezar el aislamiento. Se filtran con filtros acuosos 200  $\mu$ m antes de utilizar.
- II) Los medios fueron perfundidos a 37°C, pH 7.4 y a un flujo de 5 mL/min.
- III) Los hepatocitos fueron caracterizados por combinación de microscopía de contraste de fases, por análisis inmunocitoquímico (positivo para citoqueratina 8) y por reacción con ácido periódico de Schiff (PAS).
- IV) Los experimentos deben realizarse antes de 36 horas después del aislamiento, sino la viabilidad de los hepatocitos se reduce drásticamente

**Recubrimiento de las placas de cultivo con Colágeno tipo I** (procedente de cola de Rata, 100 mg/25 mL vial, # C3867, Sigma) para la el cultivo primario de hepatocitos:

- Preparar una solución 0.03% de colágeno en DPBS<sup>+/+</sup> estéril, siempre mezclar bien la solución madre antes de utilizarla.

$$X \text{ total mL} * (0.03\text{g}/100\text{mL}) * (25\text{mL}/100 \text{ mg vial}) * 1000 \text{ mg/g} = \text{mL Colágeno madre}$$

$$X \text{ total mL} - \text{mL Colágeno} = \text{mL DPBS}^{+/+}$$

- Dispensar la solución en los pocillos asegurando que la superficie se encuentra completamente cubierta (80  $\mu$ l/pozo para placas 96 pozos, 250  $\mu$ l/pozo para placas 24 pozos, 400  $\mu$ l/pozo para placas 12 pozos y 500  $\mu$ l/pozo para placas 8 pozos)

- Introducir las placas durante 2h en el incubador 5% CO<sub>2</sub> a 37 °C. Seguidamente aspirar el colágeno (se puede guardar estéril a 4°C y reutilizar hasta 3 veces).

- Realizar un lavado con DPBS<sup>+/+</sup> estéril. Añadir DPBS<sup>+/+</sup> estéril hasta cubrir los pozos. Se puede guardar en parafilm a 4°C durante 1 semana hasta el momento de utilizarlas (aspirar el DPBS<sup>+/+</sup>)

antes de plaquear las células).

### Protocolo del Aislamiento de Hepatocitos

- 1- Anestesiarse al ratón con una inyección intraperitoneal de ketamina/xylacina (4:1).
- 2- Pesar y colocar al animal sobre la mesa de operaciones boca arriba fijando las extremidades y se le aplica alcohol para la desinfección.
- 3- Cortar a la altura de la zona inferior del abdomen y abrir la cavidad abdominal hasta el tórax con mucho cuidado de no dañar el hígado ni el diafragma.
- 4- Desplazar los intestinos hacia la derecha hasta localizar la vena porta.
- 5- Por encima de la bifurcación de la vena mesentérica superior de la vena porta se rodea la vena porta con hilo de sutura (2/0) generando un amago de nudo. Idénticamente, se realiza un amago de nudo en la vena cava inferior a la altura del hígado.
- 6- Canular la vena porta con una jeringa de aguja de 23G y con la ayuda de un catéter BD Insite® (24 GA 0,7x19 mm; NJ, USA). Observar el retroceso de la sangre hasta el final del catéter antes de conectar al circuito de perfusión.
- 7- Fijar el catéter a la vena porta cerrando el amago de nudo realizado anteriormente.
- 8- Empezar la perfusión pasando durante 3 minutos con Medio de perfusión 1 (ver tabla de medios). Inmediatamente después de empezar la perfusión, cortar la vena cava inferior a la altura de los riñones.
- 9- Un minuto después de empezar la perfusión abrir el diafragma y cortar la vena cava por debajo del corazón y cerrar el amago de nudo realizado en la vena cava inferior a la altura del hígado.
- 10- A los tres minutos de haber empezado la perfusión cambiar a Medio de perfusión 2 (ver tabla de medios).

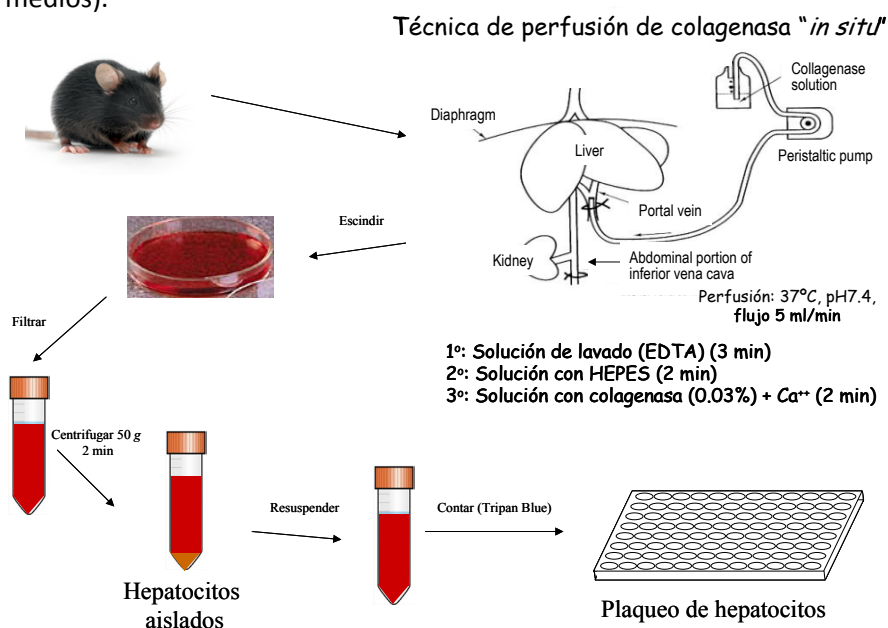


Figura suplementaria 1. Esquema del aislamiento de hepatocitos (adaptado de la tesis de Dr Martínez)

- 11- Finalmente perfundir durante 2-4 minutos con Medio de perfusión 3 (ver tabla de medios). El tiempo de perfusión de este medio determina arbitrariamente según el estado del hígado, se debe obtener un hígado esponjoso pero no demasiado degradado.
- 12- Escindir el hígado de la cavidad abdominal y se coloca en una placa de Petri con medio de cultivo frío. Mantener la placa de Petri en hielo.
- 13- A partir de este punto todo el proceso se realiza en condiciones de esterilidad, bajo campana de flujo laminar y en hielo. Se degrada el hígado con la ayuda de dos pinzas con mucho cuidado.
- 14- Filtrar a través de una malla de nylon de 100  $\mu\text{m}$  y recoger en tubo de 50 ml. Lavar varias veces la placa para recoger la mayor cantidad de células hasta obtener 40 ml.
- 15- Centrifugar a 50 g (rotor basculante) durante 2 minutos a 4°C.
- 16- Resuspender el pellet con mucho cuidado con 5 mL de medio de cultivo frío.
- 17- Hacer una alícuota de 1/10 con medio de cultivo hasta un volumen final de 10 ml para hacer un conteo más exacto.
- 18- Determinar la viabilidad y realizar el conteo mediante la solución de conteo con *Tripán Blue* en una cámara de Neubauer.
- 19- Sembrar los hepatocitos en placas de P12, P24 o P96 (según el experimento) preincubadas el día con colágeno tipo I (Sigma) y guardadas en DPBS<sup>+/+</sup> a 4°C. Es muy importante resuspender bien los hepatocitos para plaquear la misma cantidad en todos los pozos.
- 20- Mantener las células en un incubador con 5% CO<sub>2</sub> a 37 °C.

Los hepatocitos fueron sembrados a una densidad de 400.000 células/pozo en placas de 12 pozos y 200.000 células/pozo en portas "Permanox Lab-Teck Chamber Slide™ System" de 4 pocillos (Nalge Nunc, Rochester, NY, USA).

#### **4.2- Experimentos *ex vivo* de cultivos organotípico de tejido hepático fresco / cortes de alta precisión de hígado de ratón**

- 1- Pesar la agarosa UltraPure™ Low Melting (Invitrogen) necesaria para preparar 3 bloques al 4% en HBSS (30 ml en total). Añadir la agarosa al HBSS, fundir en un agitador-calentador y tapar el vaso de precipitados para evitar que se evapore demasiado (*Recomendación: calentar la agarosa hasta 65-70° cuando empiece a hervir, agitar y cambiar de baño*)
- 2- Una vez disuelta la agarosa completamente (debe quedar transparente) colocar la mezcla en un baño de agua a 38°-40°C para que se mantenga a dicha Tª.
- 3- Anestesiarse el animal con una mezcla de 0.1 mg ketamina/g p.c. y 0.01 mg xilacina/g p.c. via i.p. Cortar la vena cava inferior y desangrar el animal durante 1 min. Extraer el hígado entero

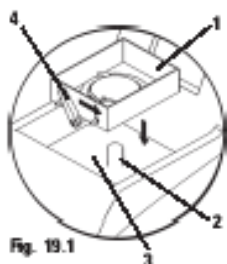
y mantenerlo en hielo en una placa de Petri con DPBS (o medio de cultivo) a 4°C (*Tener en cuenta la hora de muerte del ratón, debido a la pérdida de viabilidad del tejido hasta el momento de cultivo*).

- 4- En una placa de 100 mm, cortar con el bisturí bloques de tejido de 1 cm<sup>3</sup> aproximadamente del lóbulo hepático más grande (*mantener los bloques y el resto de hígado en DPBS a 4°C*).
- 5- Colocar el bloque de tejido en una placa de Petri pequeña (35mm), añadir la agarosa mantenida a 38-40°C e ir dándole vueltas con la espátula para que vaya intercambiando el DPBS (o medio) hasta que quede perfectamente (*es conveniente verificar que se encuentra a esta Tª para no dañar el tejido*).
- 6- Dejar el tejido en la posición deseada y colocar entonces la placa sobre hielo hasta que solidifique, aproximadamente 20 min a Tª ambiente en hielo.
- 7- En el cuarto de cultivos, (*y en condiciones estériles*) colocar 1.1ml de medio de cultivo (EWGG) en placas de petri (p35) y colocar encima los *inserts* Millicell<sup>R</sup> Cell Culture Inserts (Millipore, Billerica, MA) procurando no dejar burbujas de aire. Añadir 0.5 ml de medio EWGG en la parte superior del *insert*. Dejar equilibrar en el incubador a 37°C 20min como mínimo para que exista un intercambio de gases arriba y abajo.

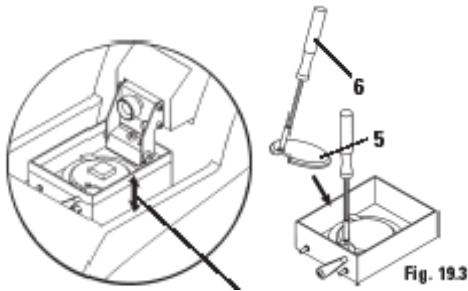
Medio de preservación: EWM 1% FBS	Medio de cultivo: EWGG
E-Williams 1%FBS 2mM L-Glutamina 50UI/ml-50ug/ml PN/Strp 0.1 µM insulina 15mM HEPES (0.89g en 25ml en E-W, pH=7.4) 50 uM β-mercaptoetanol	E-Williams con glutamax 25mM D-glucosa 50 ug/ml gentamicina

**Tabla Suplementaria 3.** Medios de preservación y cultivo de los cortes de alta precisión de hígado de ratón

- 8- Cortar el cubo de agarosa con el tejido, dejar aprox. 5mm alrededor de agarosa. Poner pegamento sobre la pletina y pegarlo bien al soporte del vibrátomo con la orientación deseada (*Recomendación: pegar el bloque por el lado en el que el tejido es más superficial*). Dejar a Tª ambiente máximo 5 min para solidificar el pegamento, después pasarlo al hielo.



- 9- Preparar el **Vibrátomo Leica VT1000S**: pasar alcohol por la cuchilla nueva (Gillette), colocarla en el portacuchillas, colocar HBSS frío (o medio) en el contenedor del buffer (1), colocar hielo en el baño de refrigeración (3).



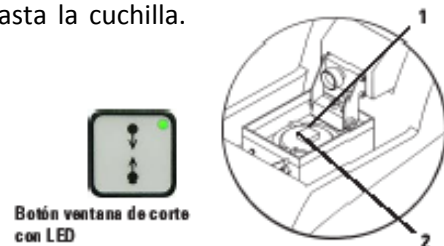
10- Colocar el soporte (5) en el "buffer tray" con ayuda del manipulador (6) y verificar que tanto la cuchilla como el bloque se encuentran cubiertos por el HBSS frío. Corregirlo si es necesario.

11- Programar el grosor del corte deseado (es aconsejable empezar a 180  $\mu$ m, una vez se realicen los primeros cortes de tejido seleccionar el grosor óptimo de 250  $\mu$ m).

12- Comprobar que la programación de la frecuencia (5) y velocidad de corte (3).

13- Con los controles UP, podemos aproximar la cubeta hasta la cuchilla.

Marcar la ventana de corte activando la led de la ventana y usando el controlador FORWARD hacemos avanzar la cuchilla para que empiece exactamente al principio (1) y al final (2) del bloque.



14- Realizar *cortes* e ir pescándolos con la ayuda de una espátula o un pincel y transferirlos a una nueva placa de petri de 6 pocillos con medio de preservación EWM 1% FBS (en hielo).

15- (*a partir de ahora trabajar en condiciones estériles*) Sembrar los *cortes* sobre los inserts con espátulas estériles (o limpiar previamente con EtOH 70%): pescarlos con una espátula y deslizarlos sobre el medio con la ayuda de otra, sin pinzar el tejido.

16- Retirar el medio necesario de la parte superior del *insert* para que el *corte* quede adherido a la membrana, retirar entre 200  $\mu$ l aproximadamente

17- Preincubar durante 1h 30 min en el incubador de cultivos primarios a 37°C y 5%CO<sub>2</sub>.

18- Reanalizar las incubaciones a testar, colocando los compuestos en la parte de abajo del *insert* y teniendo en cuenta como volumen de incubación sólo el inferior (1,1ml más de lo añadido).

19- En el momento de parar el experimento se necesita: N<sub>2</sub> líquido en una lechera, nieve carbónica, crioviales y tubos 1.5 ml etiquetados. Se pesa cada *corte* en una balanza de precisión y se congela de inmediato en N<sub>2</sub> líquido seguidamente se transfiere el criotubo a la nieve carbónica para guardarlo en el congelador -80°C para posteriores análisis.

20- Para valorar la viabilidad en cada experimento, así como el efecto de los estímulos, es preferible revisar los posibles marcadores del sobrenadante. Se recoge el medio de cultivo en un tubo 1.5 ml y se guarda en el congelador de -80°C hasta el momento de llevarlo al laboratorio en el CORE del Hospital Clínico de Barcelona para el análisis de las enzimas lactato deshidrogenasa (LDH), AST y ALT.



### 4.3- Protocolo de inducción de esteatosis hepática *in vitro*

Para determinar el grado de esteatosis hepática frente la ausencia de PPAR $\gamma$  específicamente en hepatocito o célula de Kupffer, cortes de alta precisión de hígado de ratón y hepatocitos primarios fueron cultivados en un medio proesteatótico. El medio de cultivo simula las condiciones patológicas que describen la enfermedad, hiperglucemia e hiperlipidemia.

Incubaciones durante 18h:

- Vehículo (etanol 0.04%)
- Ácido oleico (200  $\mu$ M)
- Rosiglitazona (10  $\mu$ M)
- BADGE (10  $\mu$ M)

Después del periodo de incubación se recogió el medio de cultivo para determinar el daño hepatocelular por AST y muerte celular por LDH. Los cortes de alta precisión de hígado se pesaron, traspasaron a placas de 12 pocillos para iniciar la tinción por Oil Red-O y poder cuantificar la acumulación de lípidos.

### 4.4- Tinción por Oil Red-O en hepatocitos primarios y en cultivos organotípicos de hígado

#### Reactivos

- **Solución madre de Oil red-O:** 0.7 g Oil Red-O en 200 ml isopropanol 100%, agitar durante toda la noche, filtrar y guardar a 4°C.
- **Solución de trabajo de Oil red-O:** 6 partes de Oil Red-O y 4 partes H<sub>2</sub>O. Mezclar y agitar a T<sup>o</sup> ambiente durante 20 min. Filtrar con filtro de 0.2  $\mu$ m.

La tinción para Oil Red-O se realizó siguiendo el siguiente protocolo:

- 1- Lavar las células o los cultivos organotípicos con DPBS<sup>-</sup>.
- 2- Fijar con paraformaldehído al 4% a T<sup>o</sup> ambiente durante 1 minuto.
- 3- Aspirar y poner nuevamente paraformaldehído fresco durante 2 horas.
- 4- Lavar con 60% isopropanol.
- 5- Aspirar y dejar secar unos minutos.
- 6- Añadir una solución Oil Red-O:H<sub>2</sub>O (6:4) durante 30 minutos a T<sup>o</sup> ambiente.
- 7- Lavar con 60% isopropanol (X2).
- 8- Lavar con H<sub>2</sub>O (X4). Para la cuantificación del contenido de Oil Red-O captado por las células o tejido saltar al punto 10.
- 9- En este momento, las células cultivadas en el sistema de portas de 4 pocillos fueron contrateñidos con hematoxilina y lavados con H<sub>2</sub>O del grifo. Se montaron los portas con

medio de montaje acuoso. La tinción en los hepatocitos se visualizó en un microscopio Nikon Eclipse E600 (Kawasaki, Japan) a un aumento de x100 and x200.

- 10- Lavar con 100% isopropanol en agitación durante 30 minutos a T<sup>a</sup> ambiente.
- 11- Añadir 100 ml en cada pozo por triplicado cada condición del cultivo (placas de 96 pozos).
- 12- Determinar la absorbancia a 500 nm en el lector FluoStar Optima.

#### 4.5- Modelo *in vitro* de inducción de inflamación hepática

Para evaluar el tipo de respuesta inflamatoria frente la ausencia de PPAR $\gamma$  específicamente en hepatocito o célula de Kupffer se indujo un daño agudo en cultivos organotípicos de hígado de ratón. Los cortes de alta precisión de hígado fueron preincubados durante 90 minutos a 37°C en un incubador al 5% de CO<sub>2</sub> para su estabilización encima de la membrana.

Incubaciones durante 18h:

- Vehículo (DPBS<sup>-/-</sup>)
- LPS (100  $\mu$ g/ml)
- Rosiglitazona (10  $\mu$ M)

Después del periodo de incubación se recogió el medio de cultivo para determinar el daño hepatocelular por AST y muerte celular por LDH. Los cortes de alta precisión de hígado se pesaron y congelaron en N<sub>2</sub> para análisis posteriores de expresión génica.

#### 4.6- Aislamiento y cultivo primario de células de Kupffer y CEH

Medios de cultivo de las poblaciones celulares

Medio de cultivo	Composición
<b>Cultivo de Células Hepáticas Estrelladas</b>	DMEM suplementado con:
	10% FBS, 4 mM L-glutamina, 2.2 mM piruvato de sodio, 100 IU/mL of penicilina, 100 $\mu$ g/mL estreptomina y 50 $\mu$ g/ml gentamicina; <b>pH= 7.4</b>
<b>Cultivo de Células de Kupffer (sin FBS)</b>	RPMI suplementado con:
	2 mM L-glutamina 50 IU/mL of penicilina, 50 $\mu$ g/mL estreptomina; <b>pH=7.4</b>
<b>Cultivo de Células de Kupffer (completo)</b>	RPMI suplementado con:
	10% FBS, 2 mM L-glutamina 50 IU/mL of penicilina, 50 $\mu$ g/mL estreptomina; <b>pH=7.4</b>

**Tabla Suplementaria 4.** Medios de cultivo de células estrelladas hepáticas y células de Kupffer.

Protocolo estándar

Para aislar CEH y células de Kupffer al formar parte de la fracción de células no parenquimales del hígado se utilizan 2 ratones.

- 1- Localizar la vena portal y la vena cava inferior. Utilizar tijeras clamp para sujetar el esternón.

- 2- Realizar una incisión en la vena cava inferior con una aguja de 23 G, asegurar que hay retroceso de sangre e introducir el catéter de polietileno con la Solución-1 (calentada en un baño a 38°C).
- 3- Encender la bomba del circuito con una velocidad de perfusión de 5ml/min. Iniciar el cronómetro.
- 4- Si la perfusión está bien realiza se observa un cambio en la turgencia y la coloración del hígado. Cortar la vena portal para dejar fluir la perfusión
- 5- Seguidamente abrir la cavidad torácica por debajo del esternón y sujetar la vena cava superior para bloquear el circuito de perfusión.
- 6- Cuando pasen 5 min iniciar la perfusión con la Solución-2 con la enzima colagenasa (atemperada a 38°C). *Calcular el tiempo de recorrido de la solución por el catéter para añadir la solución 2 al circuito.*
- 7- Parar la bomba una vez se compruebe que el hígado esta perfundido y tiene un aspecto esponjoso, aproximadamente al cabo de 2 min.
- 8- Recoger el hígado y colocarlo en la Solución-3, ir a la cabina de flujo laminar y en una placa de cultivo disgregar el tejido con unas pinzas.
- 9- Transferir el hígado homogenizado en un tubo de 50 ml con la Solución-3 utilizada y digerir el tejido 5 min a 37°C en agitación (70rpm).
- 10- Filtrar el hígado digerido (100 µm Nylon Cell Strainer).
- 11- Peletear el total de células a 600 g, 10min, 4°C y descartar el sobrenadante.
- 12- Peletear los hepatocitos a 70 g, 2 min, 4°C y recoger el sobrenadante que corresponde a la fracción de células no parenquimales (NPC). Repetir 2 veces.
- 13- Peletear la fracción NPC 600 g, 10min, 4°C. Resuspender el pellet en 6 ml de Solución de Geys (GBSS).
- 14- Añadir la suspensión celular a un gradiente de Nycodenz (Sigma), mezclar y añadir cuidadosamente 2ml de GBSS por la pared del tubo de 15ml
- 15- Centrifugar el gradiente 1400 g , 4°C, 30 min con 1 de aceleración y sin freno
- 16- Recoger con una pipeta Pasteur estéril la capa blanquecina de células que se encuentra entre las dos fases. Añadir 15 ml de DPBS<sup>-</sup> y centrifugar 500g, 4°C, 5 min. Repetir entre 2-3 veces.
- 17- Resuspender el pellet de células en 2 ml de DMEM completo con 10% FBS.
- 18- Contar la células por contaje mediante la solución de contaje con *Trian Blue* con un contador celular automático (10 µl células en 10µl medio contaje especial) (Countess® Automated Cell Counter, Life Technologies).

Según la adaptación del protocolo y la población de células aisladas procedemos a:

- Iniciar el protocolo de tinción específica con anticuerpos para realizar la separación y recuperación de las poblaciones de células por citometría de flujo, o
- Plaquear las CEH para realizar inmunotinción específica de PPAR $\gamma$  y expresión génica.
- Plaquear y enriquecer la población de Células de Kupffer para realizar inmunotinción específica de PPAR $\gamma$  y expresión génica.

### Adaptaciones para la separación de la fracción NPC por citometría de flujo

Medio (tiempo de perfusión)	Composición
<b>Solución-1</b> (5 min)	HBSS sin calcio ni magnesio (HBSS <sup>-</sup> ) complementado con:
	10 mM de HEPES y 0.5 mM EDTA; <b>pH=7.4</b>
<b>Solución-2</b> (2min)	HBSS sin calcio ni magnesio (HBSS <sup>-</sup> ) complementado con:
	5 mM de CaCl <sub>2</sub> , 10 mM de HEPES y 0.04% de colagenasa tipo IV (179.4 U/mL, Sigma); <b>pH=7.4</b>
<b>Solución-3</b> (5min, 37°C)	HBSS sin calcio ni magnesio (HBSS <sup>-</sup> ) complementado con:
	10 mM de HEPES, 0.001% DNasa (Roche) y 0.01% de colagenasa tipo IV (179.4 U/mL, Sigma); <b>pH=7.4</b>
<b>Nycodenz 16 %</b>	2.24 g Histodenz <sup>TM</sup> (#D2158-100G, Sigma) en 7 ml GBSS (32% inicial) Filtrar y recoger 6ml en un tubo de 15 ml. Congelar en vertical a -20°C

Tabla Suplementaria 5. Soluciones de perfusión y gradiente de Nycodenz para aislamiento de la fracción NPC.

### Adaptaciones para aislamiento de células para CEH

Medio (tiempo de perfusión)	Composición
<b>Solución-1</b> (5 min)	HBSS sin calcio ni magnesio (HBSS <sup>-</sup> ) complementado con:
	10 mM de HEPES y 0.5 mM EDTA; <b>pH=7.4</b>
<b>Solución-2</b> (2min)	HBSS sin calcio ni magnesio (HBSS <sup>-</sup> ) complementado con:
	5 mM de CaCl <sub>2</sub> , 10 mM de HEPES y 0.09 U/ml de colagenasa A (0.253 U/mL, Roche); <b>pH=7.4</b>
<b>Solución-3</b> (5min, 37°C)	HBSS sin calcio ni magnesio (HBSS <sup>-</sup> ) complementado con:
	10 mM de HEPES, 0.01% DNasa (Roche), 0.05% Pronasa (Roche) y 0.04% de colagenasa A (0.253 U/mL, Roche); <b>pH=7.4</b>
<b>Nycodenz 14 %</b>	1.96 g Histodenz <sup>TM</sup> (#D2158-100G, Sigma) en 7 ml GBSS (32% inicial) Filtrar y recoger 6ml en un tubo de 15 ml. Congelar en vertical a -20°C

Tabla Suplementaria 6. Soluciones de perfusión y gradiente de Nycodenz para aislamiento de CEH.

### Adaptaciones para aislamiento de Células de Kupffer

Medio (tiempo de perfusión)	Composición
<b>Solución-1</b> (5 min)	HBSS sin calcio ni magnesio (HBSS <sup>-</sup> ) complementado con:
	10 mM de HEPES y 0.5 mM EDTA; <b>pH=7.4</b>
<b>Solución-2</b> (2min)	HBSS sin calcio ni magnesio (HBSS <sup>-</sup> ) complementado con:
	5 mM de CaCl <sub>2</sub> , 10 mM de HEPES y 0.04% de colagenasa tipo IV (179.4 U/mL, Sigma); <b>pH=7.4</b>
<b>Solución-3</b> (5min, 37°C)	HBSS sin calcio ni magnesio (HBSS <sup>-</sup> ) complementado con:
	10 mM de HEPES, 0.001% DNasa (Roche) y 0.01% de colagenasa tipo IV (179.4 U/mL, Sigma); <b>pH=7.4</b>
<b>Nycodenz 16 %</b>	2.24 g Histodenz <sup>TM</sup> (#D2158-100G, Sigma) en 7 ml GBSS (32% inicial) Filtrar y recoger 6ml en un tubo de 15 ml. Congelar en vertical a -20°C

**Tabla Suplementaria 7.** Soluciones de perfusión y gradiente de Nycodenz para aislamiento de Células de Kupffer.

- Centrifugar el gradiente durante 45 min a 23000g a 4°C, sin freno. Contar y resuspender las CK en RPMI sin FBS.
- Cultivar durante 1h en el incubador de 37°C 5%CO<sub>2</sub> para que las CK se adhieran.
- Lavar con DPBS<sup>-</sup> para descartar y eliminar las células no adheridas, los hepatocitos y CEH.
- Añadir nuevo medio RPMI completo (10% FBS) para cultivar CK.

#### 4.7- Inmuntinción de macrófagos para citometria de flujo

Las células obtenidas tras la purificación de la fracción NPC (CEH y CK) se sometieron al siguiente protocolo para la tinción específica de los macrófagos (CK) con los anticuerpos Cd11b y F4/80. De esta forma podremos separar específicamente las CEH detectadas por autofluorescencia de las CK identificadas por el doble marcaje con los anticuerpos.

Determinar el número de tubos necesarios y ajustar el volumen de células respecto el contaje obtenido a 300.000-500.000 células en 400 µl

##### Bloqueo

Incubar la suspension celular con el Fc Block (dil:1:200, ex: add 10 µl en 2 ml of cells). 15 min a 4°C

##### Incubación con los Anticuerpos

En eppendorfs se preparan las diluciones de los anticuerpos con BSB. Se distribuyen las células en tubos para citometria a una densidad 500.000 células en 400 µl. Proteger de la Luz al trabajar con los Anticuerpos marcados con fluorescencia y siempre en hielo (4°C)

Densidad celular → 500.000 células / 400 µl

- AUTOfluorescencia: células no marcadas
  - ISOTIPICO (IgG específicas con fluoróforo): 500.000 cells  $\rightarrow$  Dil Cd11b Isotipo = 3  $\mu$ l + 9ul BSB  $\rightarrow$  5  $\mu$ l  
Dil F4/80 Isotipo = 3  $\mu$ l + 9ul BSB  $\rightarrow$  8  $\mu$ l
  - Cd11b +: 500.000 células / 400  $\rightarrow$  Dilución Cd11b<sup>+</sup> = 3  $\mu$ l anticuerpo + 9  $\mu$ l BSB  $\rightarrow$  5 ul tubo de células
  - F4/80 +: 500.000 células/ 400  $\rightarrow$  Dilución F4/80<sup>+</sup> = 5  $\mu$ l + 15  $\mu$ l BSB  $\rightarrow$  8  $\mu$ l tubo de células
  - Cd11b-F4/80 ++ : 500.000 células / 400  $\rightarrow$  Dilución de los anticuerpos  $\rightarrow$  5  $\mu$ l Cd11b + 8  $\mu$ l F480
- Tiempo de Incubación de los anticuerpos: 50 minutos

#### Limpiar y procesar

- Añadir 1ml de BSB a las muestras para diluir los anticuerpos.
- Centifugar 5min a 500 g 4°C.
- Eliminar el sobrenadante con cuidado. Resuspender el pellet celular y añadir 500  $\mu$ l de BSB.
- Filtrar las muestras y analizar en el citometro de flujo **FACSAriaSORP** y el software *FACSDiva* v3.1.3 (BD Biosciences, San Jose, CA)

Anticuerpos y reactivos para citometria de flujo
Mouse BD Fc Block (# 553141 BD). Guardado sin diluir en 4 °C
Rat anti mouse F4/80 antígeno-FITC (# MCA497FA AbD Serotec). Alícuotas guardadas en -20°C.
Rat IgG2b Negative control-FITC (# MCA1125FT AbD Serotec). Alícuotas guardadas en -20°C.
Anti-mouse CD11b-APC (# 17-0112 eBioscience). Alícuotas guardadas en 4°C.
Anti-mouse CD11b-APC (# 17-0112 eBioscience). Alícuotas guardadas en 4°C.
<b>Basic Sorting Buffer (BSB):</b> 1x PBS (sin Ca/Mg <sup>++</sup> ) 1mM EDTA 25 mM HEPES pH=7.0 1% FBS (inactivado por calor) 0.2 $\mu$ m filtro esteril. Guardado en 4 °C
FACS 5 ml tubos( #352052 (125/pack), BD Falcon)

Tabla Suplementaria 8. Descripción de los anticuerpos marcados con fluorescencia y el otros componentes utilizados en la citometria de flujo

#### 4.8- Inmunocitoquímica de PPAR $\gamma$ en células de Kupffer y CEH

Células utilizadas para el análisis inmunocitoquímico de la expresión proteica de PPAR $\gamma$ :

- CEH quiescentes (75.000 células) en DMEM con 10% FBS fueron inmovilizadas en un portaobjetos de un pocillo utilizando citocentrífuga Cytospin (Thermo Scientific). Realizar una dilución 1/80 del total de células y centrifugar 500 g 5min, velocidad media, T<sup>a</sup>.
- CEH activadas (70.000-100.000 células) en DMEM con 10% FBS fueron cultivadas durante 9 días en portas de 8 pocillos (*Polystyrene Vessel Tissue Culture Slides*, BD Biosciences) en un incubador al 5% de CO<sub>2</sub>. El medio fue cambiado cada 2 días.

- El cultivo de Células de Kupffer (150.000 células) se enriqueció al dejarlas adhesión al plástico durante 1 h en portas de 8 pocillos (*Nunc Lab-Tek Chamber Slide system 8 wells Permanox Slide*, Thermo Scientific). Las células no adherentes se descartaron al lavar dos veces con DPBS<sup>-/-</sup>. Las CK se cultivaron durante 1 día en RPMI suplementado con 10% FBS.

#### Protocolo

1- Lavar las células con DPBS<sup>-/-</sup> dos veces.

Fijar y permeabilizar con Metanol:Acetona frío (guardado a -20°C) durante 10 min. Realizar la tinción en cámaras húmedas y oscuras específicas para inmunocitoquímica.

2- Lavar 2 veces con PBS 1x (5min cada lavado).

3- Bloquear con 5% de suero de cabra en PBS 1x (Roche Diagnostics) durante 1h a T<sup>o</sup>

4- Incubar con el anticuerpo primario de PPAR $\gamma$  (dilución 1:100) durante toda la noche a 4°C (anticuerpo creado en conejo contra una proteína recombinante de ratón correspondiente a los aminoácidos 6 – 105 de PPAR $\gamma$ , #sc-7196, Santa Cruz Biotechnology, CA). Solución de bloqueo del anticuerpo: BSA 1% y el detergente Tritón X-100 al 0.3% en PBS 1x.

5- Lavar 3 veces con PBS 1x.

6- Incubar con anticuerpo secundario marcado con el fluoróforo CY3 (rojo) (*en cabra contra la IgG (H+L) de conejo*) (dilución 1:100) (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA) durante 1 h a T<sup>o</sup>. Solución de bloqueo del anticuerpo: BSA 1% y el detergente Tritón X-100 al 0.3% en PBS 1x.

7- Lavar 3 veces con PBS 1x.

8- Los núcleos son marcados con el fluoróforo DAPI (azul) que se encuentra en el medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Poner una gota del medio en los cubreobjetos y dejar caer el portaobjetos encima, tapar y dejar secar el montaje durante la noche.

9- Guardar la tinciones a 4°C protegidas de la luz, o a -20°C para periodos más largos.

Las imágenes fueron captadas en el microscopio de fluorescencia Olympus BX51 a una magnificación de x400 (software *Cell F*) y unidas utilizando el programa *Image J*.

#### **4.9- Aislamiento y cultivo primario de macrófagos peritoneales**

Los macrófagos residentes se recogieron del peritoneo a partir de un lavado y agitación durante 5 minutos con 7 ml de DPBS<sup>-/-</sup>. Se centrifuga durante 5 min a 500g 4°C los exudados y se resuspende el pellet de células en 1ml de DMEM suplementado penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100

$\mu\text{g/ml}$ ), L-glutamina (2 mM), and 5% FBS. Las células se cultivan en placas de Petri de  $60\text{cm}^2$  en un incubador a  $37^\circ\text{C}$  y 5%  $\text{CO}_2$  durante 2h para que los macrófagos peritoneales se adhieran completamente. Se aspiran las células no adheridas y se lavan con DPBS<sup>-/-</sup> 2 veces antes de recogerlas con el reactivo Trizol para evaluar la expresión génica.

## 5- Análisis de la expresión génica

### 5.1- Extracción de ARN

El ARN total del hígado y de las células primarias fue obtenido utilizando el protocolo del reactivo Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA). Por otra parte, el ARN procedente de los cultivos organotípicos de hígado fue obtenido a través del kit RNeasy<sup>®</sup> Plus Mini Kit siguiendo las instrucciones del fabricante con pequeñas modificaciones (Qiagen, Hilden, Germany).

La concentración de ARN fue calculada en un espectrofotómetro UV (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE) y su integridad testada en el 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Las muestras de RNA fueron retrotranscritas con el kit *high-capacity cDNA archive* (Applied Biosystems, Foster City, CA) para la obtención del cDNA que fue utilizado en las técnicas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional y cuantitativa.

### 5.2- PCR convencional

- La amplificación de los genes PPAR $\gamma$  y GAPDH (utilizado como control de carga) se realizó mediante PCR con oligonucleótidos específicos diseñados con el *software* PrimerSelect (DNASar Inc, Lasergene, Madison, WI). A partir de ARN obtenido de hepatocitos primarios se obtuvo el cDNA con el kit *high-capacity cDNA archive* (Applied Biosystems). Los reactivos en la reacción consistieron en: 2  $\mu\text{l}$  de cDNA, 2.5  $\mu\text{l}$  buffer 10, 1.25  $\mu\text{l}$   $\text{MgCl}_2$  (2.5 mM), 4  $\mu\text{l}$  DNTPs (1.25 mM) y 0.2  $\mu\text{l}$  polimerasa BioTherm<sup>™</sup> DNA (5U/ $\mu\text{l}$ ) (Genecraft, Colonia, Alemania). Cada gen requiere unas condiciones específicas de concentración de magnesio y de cebadores, así como una T<sup>a</sup> de hibridación característica:

Gen	Secuencia de los cebadores	T <sup>a</sup> hibridación	V <sub>RT</sub> [ $\text{MgCl}_2$ ]	Tamaño de producto (bp)
PPAR $\gamma$ (S)	5'-CACAGGCCGAGAAGGAGAAGC	54.6	2.5	373
PPAR $\gamma$ (A)	5'-AGGGAGGCCAGCATCGTGTAG			
GAPDH (S)	5'-TCCAGTATGACTCCACTC	59	2	279
GAPDH (A)	5'-ATTTCTCGTGGTTCA CAC			

**Tabla Suplementaria 9** Secuencias, T<sup>a</sup> de hibridación, concentración de  $\text{MgCl}_2$  y tamaño de producto para los cebadores correspondientes al gen PPAR $\gamma$  y GADPH. Abreviaciones: S, sentido; A, antisentido



- La reacción de PCR consistió en una primera desnaturalización del ADN genómico durante 4min a 96°C, seguidos de 35 ciclos de amplificación de 96°C (30 segundos), T<sup>a</sup> de hibridación según los cebadores utilizados (1 min) y 72°C (30 segundos).
- La especificidad de los cebadores se confirmó a través de la secuenciación directa de los productos amplificados durante las PCRs. Los productos fueron tratados con el reactivo Exo-SAP para eliminar los cebadores y los dNTPs sobrantes de la reacción de PCR. La reacción de secuenciación se realizó utilizando el reactivo “*Big Dye Terminator version 3.1 Cycle Sequencing Kit*” (Applied Biosystems) con el analizador genético *ABI Prism 3130xl* (Applied Biosystems). Una vez obtenida la secuencia se analizó su similitud con la base de datos del GenBank utilizando la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).
- Los productos de la PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2.5% y visualizados en un transiluminador UV mediante la tinción con bromuro de etidio, utilizando como marcador de peso molecular el 100-bp DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA).

### 5.3- PCR a tiempo real

El análisis cuantitativo de la expresión génica se realizó mediante PCR a tiempo real en el *ABI Prism 7900 Sequence Detection System* (Applied Biosystems). Para las reacciones estándar (2h aprox) se utilizaron 1 µl de cDNA en un volumen final de 20 µl y el reactivo *TaqMan Fast Universal PCR Master Mix* (#4352042, Applied Biosystems). Para las reacciones fast (30min aprox) se utilizaron 1.5 µl de cDNA en un volumen final de 10 µl y el reactivo *Taqman Universal PCR MasterMix 20x* (#4364338, Applied Biosystems). Los cebadores y las sondas validadas *TaqMan Gene Expression Assays* fueron usados para cuantificar los genes del estudio (descritos en la tabla inferior), utilizando como control endógeno la expresión de β-actina. Los cebadores y la sonda personalizada para la isoforma 1 de PPAR $\gamma$  fueron diseñados utilizando el programa Primer Express<sup>®</sup> Software para PCR a tiempo real (versión 3.0, Applied Biosystems). Utilizando este programa fuimos capaces de diseñar cebadores que amplifican el transcrito de PPAR $\gamma$ 1 entre el E2 y E4 según NCBI/ENSEMBL.

Los resultados de la PCR fueron analizados con el *Sequence Detector Software* (version 2.1; Applied Biosystems) y posteriormente con el *RQ Manager* (versión 1.2) junto con *Sequence Detector Software* (versión 2.3) de Applied Biosystems. La cuantificación se realizó usando el método comparativo del  $\Delta$ Ct, donde el incremento de expresión normalizado con la β-actina y relativo a un calibrador arbitrario se determinó con la fórmula aritmética  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  descrita en el método comparativo del  $\Delta$ Ct.

Gen	Nombre completo	ID
$\alpha$ -SMA	$\alpha$ -actina de músculo liso	Mm01546133_m1
aP2	Proteína adiposa-2 / Proteína de unión 4 a AG (FABP4)	Mm00445878_m1
ACC	Acetil-CoA carboxilasa	Mm01304285_m1
ACO	Acetil-CoA oxidasa	Mm00443579_m1
Arg	Arginasa	Mm00475988_m1
CXCL2	Quemoquina de ligando 2 (motivo C-X-C) / Proteína inflamatoria de macrófago 2 (MIP-2)	Mm00436450_m1
COX-2	Ciclooxigenasa-2	Mm00478374_m1
FASN	Sintasa de ácidos grasos	Mm00662319_m1
Fbp1	Fructosa 1,6-bifosfatasa	Mm00490181_m1
G6Pc	Glucosa-6-fosfatasa catalítica	Mm00839363-m1
GLUT-2	Transportador de glucosa tipo 2	Mm00446224_m1
IL-1 $\beta$	Interleuquina-1 $\beta$	Mm01336189_m1
IL-6	Interleuquina-4	Mm00445259_m1
IL-6	Interleuquina-6	Mm00446190_m1
IL-10	Interleuquina-10	Mm00439641_m1
IRS-2	Substrato del receptor de insulina 2	Mm03038438_m1
LPL	Lipasa de lipoproteínas	Mm00434764_m1
L-FABP	Proteína de unión a ácidos grasos del hígado	Mm00444340_m1
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1	Mm00441242_m1
MMP-2	Metaloproteínasa de matriz-2	Mm00439506_m1
MTP	microsomal triglyceride transfer protein	Mm00435015_m1
PPAR $\alpha$	Receptor $\alpha$ activado por proliferadores del peroxisoma	Mm00440939_m1
PPAR $\gamma$	Receptor $\gamma$ activado por proliferadores del peroxisoma	Mm00440945_m1
PPAR $\gamma$ 2	PPAR $\gamma$ isoforma 2	Mm00440940_m1
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa	Mm00440636_m1
PC	Piruvato Carboxilasa	Mm00490181_m1
SREBP-1c	Proteína de unión elemento de respuesta de estero1 1c	Mm00550338_m1
SCD1	Estearoil-Coenzima A desaturasa 1	Mm00772290_m1
TIMP-1	Inhibidor tisulares de las metaloproteínasa-1	Mm00441818_m1
TGF $\beta$	Factor de crecimiento tisular $\beta$	Mm00441724_m1
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral $\alpha$	Mm00443258_m1
$\beta$ -actina	$\beta$ -actina	Mm00607939_s1

Tabla Suplementaria 10. Sondas validadas *TaqMan Gene Expression Assays* utilizadas en el análisis de expresión génica

## VI- Análisis de la expresión proteica

### 6.1- Extracción de proteínas totales

1- Homogeneizar con Ultra-Turrax 30 mg de hígado, 50mg de músculo y 100 mg de tejido adiposo en 1 mL de tampón de homogeneización RIPA a 4°C.

Tampón RIPA modificado
50 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, 1% Igepal, 0.25% deoxicolato sódico, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM fluoruro sódico (NaF), 1 mM ortovanadato sódico (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> ), e Inhibidor de proteasas7x (Complete Protease Inhibitor Cocktail, Roche) <i>Se puede sustituir PMSF, NaF, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> por el Inhibidor de fosfatasas 10x (PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets, Roche)</i>

2- Incubar los homogenados en hielo durante 15 minutos a 4°C, vorteadando cada 5 minutos.

**Tabla Suplementaria 11.** RIPA modificado para la extracción de proteínas

3- Sonicar en hielo (solamente para el caso del tejido adiposo): 5 ciclos de 15 segundos subiendo al máximo y bajando, entre ciclos reposar las muestras en hielo.

4- Centrifugar a 16100 g a 4°C durante 20 minutos.

5- Recoger el infranadante, cuantificar las proteínas y congelar en alícuotas a -20°C.

### 6.2- Extracción de proteínas nucleares

#### Protocolo para el Western blot de PPAR $\gamma$

*Calcular el volumen necesario de Buffer según el número de muestras para complementarlos con los inhibidores y detergentes justo antes de empezar el protocolo*

1- Homogeneizar 100 mg de hígado con Ultra-Turrax en 1 ml de Buffer HB.

2- Filtrar con una malla de nylon de 250  $\mu$ m de poro el lisado y recoger el filtrado en un nuevo eppendorf.

3- Centrifugar a 3000 rpm 20 min a 4°C.

El sobrenadante es el extracto de proteínas citoplasmáticas, se puede guardar a -80°C.

4- Lavar el pellet de proteínas con HB (centrifugar 10 min) (x2).

5- Resuspender el pellet en ½ volumen del tamaño del pellet con Buffer NB (aprox 50  $\mu$ l).

6- Vórtex durante 15 min, en hielo.

7- Mezclar el contenido colocando las muestras en la noria durante 1h a 4°C.

8- Centrifugar a 14000 rpm 20 min a 4°C.

El sobrenadante es el extracto de proteínas del núcleo, alícuotar y guardar a -80°C.

9- Determinar el contenido de proteínas con el kit de microBCA, pero si interfiere la cantidad de EGTA del Buffer NB utilizar el método Bradford.

Buffer Homogenización de Tejido (HB)			Buffer de Extracción Nuclear (NB)		
10 mM HEPES			20 mM HEPES		
1.5 mM MgCl <sub>2</sub>			1.5 mM MgCl <sub>2</sub>		
10 mM KCl			420 mM NaCl		
0.3 mM sucrosa			0.2 mM EDTA		
0.1 mM EGTA , pH=7.9			0.1 mM EGTA		
Guardar a 4°C			25 % glicerol , pH=7.9      Guardar a 4°C		
	[inicial]	[Final]		[inicial]	[Final]
DTT	0.5 M	0.5mM	DTT	0.5 M	1mM
PMSF	0.1 M	0.5mM	PMSF	0.1 M	0.5 mM
Ortovanadato sódico	100mM	1 mM	Ortovanadato sódico	100mM	1mM
Pepstaina*	0.25mg/mL	1 $\mu$ g/ml	Pepstaina*	0.25mg/mL	1 $\mu$ g/ml
Leupeptina*	0.25mg/mL	5 $\mu$ g/ml	Leupeptina*	0.25mg/mL	5 $\mu$ g/ml
Aprotinina*	2 mg/mL	0.15 U/ml	Aprotinina*	2 mg/mL	10 $\mu$ g/ml
Fluoruro sódico (NaF)	1 M	1 mM	Espermidina	1M	0.5 mM
Nonidet P-40	100 $\mu$ L/10mL	0.1%	*En caso de utilizar Inhibidores de proteasas 7x (Complete Protease Inhibitor Cocktail, Roche) diluir a 1x		

**Tabla Suplementaria 12.** Componentes de los Buffers de extracción de proteínas nucleares por el método tradicional

### Protocolo para la determinación de la actividad de NF- $\kappa$ B

La actividad de NF- $\kappa$ B se determinó a partir de proteínas nucleares de hígado mediante el kit Nuclear Extraction (#2900, Millipore) siguiendo las instrucciones del fabricante pero con pequeñas modificaciones. Una vez se descarta el sobrenadante de proteínas citoplasmáticas, el pellet resultante se resuspende utilizando un homogenador tipo Dounce (Pellet pestles and cordless motor, Sigma) y se lisa utilizando agujas de pequeño calibre (26G). Los lisados se mezclan durante 1h en una noria a 4°C. El extracto nuclear final (volumen=80-100  $\mu$ l) se puede cuantificar por el método de micro BCA.

## 6.3- Cuantificación de proteínas

### 6.3.1- Bradford

Adaptación del método Bradford (#1-800-424-6723, BioRad) para placas de 96 pocillos. El Bradford utiliza el reactivo Coomassie Blue G-250 que sin proteína es de color rojizo-marrón y ácido, una vez se une a la proteína cambia su pKa y el color se vuelve azul. Es un método fácil, sensible y rápido.

- 1- Preparar diluciones de las muestras: 1/40 o (multiplicar el resultado de la regresión por 1/800 como dilución final) para proteínas totales de hígado y 1/300 para extractos nucleares de hígado. En la placa se realiza un dilución 1/20 con el reactivo.

- 2- Preparar la recta estándar a partir de una dilución 1/20 de BSA (10 mg/mL). Con la dilución 1/20 que se efectúa en placa quedaran las siguientes concentraciones con las que se realizará la regresión lineal: S1 (25), S2 (12.5), S3 (6.25), S4 (3.125) y S5 (1.56) (µg/mL) en el mismo medio diluido en el que se encuentran las muestras.
- 3- Añadir 10 µl de muestra diluida por triplicado y 10 µl de estándares por duplicado en una placa de 96 pozos.
- 4- Añadir a cada pozo 200 µl de *Bradford 1x* (atemperar el reactivo de BioRad 30 min antes de realizar la dilución 1/5 en H<sub>2</sub>O MilliQ).
- 5- Incubar durante 5 min a T<sup>a</sup> y tapado de la luz.
- 6- Determinar la absorbancia del colorante a 595 nm en el espectrofotómetro de placas y calcular la concentración por regresión lineal en la curva estándar.

### 6.3.2- MicroBCA

La cuantificación de las proteínas obtenidas se realizó mediante el método BCA con el kit de MicroBCA™ Protein Assay Kit (Pierce) siguiendo el siguiente protocolo.

- 7- Preparar diluciones de las muestras: 1/800 o 1/1000 para proteínas totales de hígado, 1/500 para proteínas totales de músculo, 1/300 para proteínas totales de tejido adiposo y 1/300 para extractos nucleares de hígado.
- 8- Preparar la recta estándar con BSA (2 mg/mL): 40; 20; 10; 5; 2,5; 1; 0,5 i 0 µg/mL en el mismo medio en el que se encuentran las muestras.
- 9- Añadir 150 µl de muestra diluida por triplicado y 150 µl de estándares por duplicado en una placa de 96 pozos.
- 10- Añadir a cada pozo 150 µl de *Working Reagent* (reactivos A:B:C mezclados con una proporción de 25:24:3). *Alternativamente se puede trabajar con 100 µl de muestra diluida y 100 µl de reactivos.*
- 11- Incubar durante 2 horas en la estufa a 37°C. *Se puede acelerar el proceso incubando un min de 15 min a 65°C.*
- 12- Determinar la absorbancia a 562 nm en el espectrofotómetro de placas y calcular la concentración extrapolando por regresión lineal en la curva estándar.

### 6.4- Determinación de los niveles de proteína (Western blot)

Para analizar la expresión de proteínas concretas se utilizó la técnica del Western blot. La proteína total de hígado, músculo esquelético y tejido adiposo epididimal fue extraída utilizando el Tampón modificado RIPA. En el caso de los extractos nucleares de hígado se utilizó el protocolo

de extracción tradicional para analizar la cantidad de proteína de PPAR $\gamma$  localizada en el núcleo. Cantidades iguales de proteína nuclear de hígado (40  $\mu$ g), y proteína total de hígado (50  $\mu$ g), músculo esquelético (80  $\mu$ g) y tejido adiposo (100  $\mu$ g) se mezclaron con tampón de carga Laemmli (contiene SDS para desnaturalizar la proteína) y se cargaron en los geles.

Tampones y buffers:

Tampón/Solución	Composición
Upper buffer	0.5 M Tris, <b>pH 6.8</b>
Gel de apilación	0.9 mL Acrilamida/Bisacrilamida 40%, 1.2 mL Upper buffer, 7.22 mL H <sub>2</sub> O, 100 mL SDS 10%, 570 mL APS 10%, 5 mL TEMED
Lower buffer	1.5 M Tris, <b>pH 8.8</b>
Gel de resolución al 12%	3 mL Acrilamida/Bisacrilamida 40%, 2.5 mL Lower buffer, 4.29 mL H <sub>2</sub> O, 100 mL SDS 10%, 60 mL APS 10%, 5 mL TEMED
Tampón de electroforesi 10x	1.91 M Glicina, 251 mM Tris, 34,67 mM SDS
Tampón de carga Laemli 6x	7 mL Upper buffer, 3.6 mL glicerol, 1g SDS, 600 mL $\beta$ -mercaptoEtOH, 4mg azul de bromofenol
Tampón de transferencia 10x	1.91 M Glicina, 251 mM Tris
Tampón de transferencia 1x	70% H <sub>2</sub> O, 20% MeOH, 10% Tampón de transferencia 10x
TBS	20 mM Tris, 0.5 M NaCl, <b>pH 7.6</b>
TBST-T	0.1% Tween en TBS, 10 $\mu$ L cada 10 mL
Tampón de bloqueo	5% leche desnatada en polvo (1.25g), 0.1% Tween 20 (25 $\mu$ l) en TBS (25ml)
Solución anticuerpos primarios	5% BSA, 0.1% Tween 20 en TBS con la cantidad adecuada de anticuerpo
Tampón de <i>stripping</i>	100 mM $\beta$ -mercaptoEtOH, 2% SDS, 62.5 mM Tris, <b>pH 6.7</b> Poner la membrana en un falcon con tampón 20min a 50°C en agitación

**Tabla Suplementaria 13.** Tampones y soluciones necesarios para el Western blot

Otros reactivos:

- Marcador de peso molecular: **Range Rainbow Molecular Weight Markers** (12.000-225.000 Da) (#RPN800E GE Healthcare, Amersham)
- Stripping de la membrana: **Restore™ Western Blot Stripping Buffer** (Thermo Scientific). Incubar 15 min a T<sup>a</sup> en agitación
- Revelado de la membrana: **ECL Western Blotting System kit** (GE Healthcare, Amersham)
- Revelado de la membrana: **EZ-ECL Chemiluminescence Detection Kit for HRP** (Biological

*Industries, Haemek, Israel)*

-Proteína recombinante PPAR $\gamma$  como control positivo: **PPAR $\gamma$  FL (human recombinant from Sf1 cells)** (#10009987, Cayman) (0.5 ng/uL, cargar 3ng)

Anticuerpos primarios

Antígeno	Referencia y Procedencia	Dilución	Huésped
<b>PPAR<math>\gamma</math> - Ratón</b>	#sc-7196, Santa Cruz	1:200	Conejo
<b>SAPK/JNK (56G8) - Ratón</b>	#9258, Cell Signaling	1:250	Conejo
<b>P-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) - Ratón</b>	#9251, Cell Signaling	1:250	Conejo
<b>CREB (48H2) - Ratón</b>	#9197, Cell Signaling	1:500	Conejo
<b>P-CREB (Ser133) - Ratón</b>	#9191, Cell Signaling	1:500	Conejo
<b>Caspasa-3 procesada (Asp175) - Ratón</b>	#9661, Cell Signaling	1:500	Conejo
<b>Caspasa-3 - Ratón</b>	#9662, Cell Signaling	1:1000	Conejo
<b>GAPDH</b>	#Ab8245, Abcam	1:1000	Conejo
<b>Anticuerpo secundario HRP - Conejo</b>	#NA934, Amersham	1:2000	Asno

**Tabla Suplementaria 14.** Antígeno, huésped, tipo de dilución y referencias de los anticuerpos utilizados.

En el caso de determinar proteínas fosforiladas, en primer lugar analizaremos la proteína fosforilada y a continuación realizaremos un stripping para determinar la proteína total; en estos casos se puede hacer un segundo stripping para incubar con el anticuerpo utilizado como control de carga (GAPDH).

Procedimiento:

- 1- Preparar el gel de resolución a la concentración de acrilamida (%) que interese según el peso molecular de la proteína de interés y el gel de apilamiento en vidrios de 1.5 mm.
- 2- Cargar las muestras con tampón de carga Laemmli al 6X. Desnaturalizar las muestras durante 5 min a 95°C.
- 3- Montar los geles en la cubeta con el tampón de electroforesis y cargar las muestras, además del marcador de peso molecular (El volumen de carga será variable según la cantidad de proteína que interese. Utilizando peines de 10 pocillos y en un gel de 1.5 mm el volumen máx de carga es de 48  $\mu$ l)
- 4- Correr la electroforesis a 120V durante 2 horas (Variar el tiempo de transferencia según el peso molecular de la proteína de interés y el nivel de separación entre proteínas que deseamos).

- 5- Desmontar la electroforesis y mantener el gel en tampón de transferencia durante 15 minutos.
- 6- Activar las membranas de PVDF (15 seg MeOH, 2 min H<sub>2</sub>O y 5min en tampón de transferencia)
- 7- Montar los casetes de transferencia con el gel, la membrana, el papel de filtro y las esponjas.
- 8- Correr la transferencia a 400mA durante 2 horas a 4°C.
- 9- Comprobar la eficiencia de la transferencia tiñendo con Ponceau S.
- 10- **Bloqueo:** Incubar las membranas con el tampón de bloqueo durante 1 hora a T<sup>a</sup> ambiente.
- 11- **Anticuerpo 1ario:** Incubar durante toda la noche a 4°C con la solución del anticuerpo primario para la proteína
- 12- Lavar con TBS-0.1% Tween 20 tres veces.
- 13- **Anticuerpo 2ario:** Incubar con el anticuerpo secundario unido a peroxidasa durante 1 hora a T<sup>a</sup> ambiente.
- 14- Lavar (como en el paso 11).
- 15- **Revelar:** Incubar con el reactivo ECL durante 1 minuto y visualizar las bandas con el LAS4000 (Fujifilm).
- 16- **Stripping** de las membranas: Incubar con tampón de *stripping* durante 20 minutos a 50°C con agitación.
- 17- Lavar con TBS-0.1% Tween 20 cuatro veces
- 18- Bloquear las membranas durante 1 hora.
- 19- Incubar con el **Anticuerpo 1ario** durante toda la noche a 4°C
- 20- Lavar (como en el paso 11).
- 21- Incubar el **Anticuerpo 2ario** unido a peroxidasa durante 1 hora a T<sup>a</sup> ambiente.
- 22- Lavar (como en el paso 11).
- 23- **Revelar** con ECL y visualizar.

Modificaciones del protocolo estándar según el tipo de proteína a analizar:

Proteína	Peso (kDa)	%Gel resolución	Tiempo electroforesis	Bloqueo
<b>PPAR<math>\gamma</math></b> (anticuerpo secundario, 1:5000)	PPAR $\gamma$ 2 57 kDa PPAR $\gamma$ 1 53 kDa	10	90 min	3% BSA
<b>SAPK/JNK y P-SAPK/JNK</b>	JNK2 54 kDa JNK1 46 kDa	12	120 min	5% BSA
<b>CREB y P-CREB</b>	43 kDa	12	100 min	5% BSA
<b>Caspasa-3</b>	procaspasa 35 kDa procesada 17/19 kDa	15	120 min	5% BSA

**Tabla Suplementaria 15.** Condiciones específicas para los Westerns realizados en la tesis.



### 6.5- Análisis de la actividad caspasa-3/7

- 1- Homogeneizar 30 mg de hígado con mini-émbolo (Pellet pestles and cordless motor, Sigma) en 1 ml de Tampón Hipotónico.
- 2- Centrifugar a 16000 g 15 min a 4°C.
- 3- El sobrenadante son las proteínas citoplasmáticas, se recoge y guarda a -80°C.
- 4- Valorar la cantidad de proteína por el método Bradford (dilución de muestra 1/25, final 1/500).
- 5- Ajustar con el buffer hipotónico la concentración de proteína de las muestras a 100 µg/ml en una placa blanca de 96 pocillos (#165306, Nunc)
- 6- Se determinó la actividad caspasa 3/7 por luminiscencia utilizando el kit *Caspase-Glo 3/7 assay* (#G0890 for 2,5ml=25assay or #G8091 for 10ml=100 assay, Promega, Madison, WI). Antes de la lectura agitar 4 min a 200rpm. Realizar 3h de lectura de luminiscencia (determinar cada 15 min), teniendo en cuenta que la primera hora es la incubación del reactivo.

#### Tampón hipotónico

25 mM HEPES, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA e Inhibidor de proteasas7x (Complete Protease Inhibitor Cocktail, Roche) **pH= 7.5**

**Tabla Suplementaria 16.** Componentes tampón hipotónico

El kit contiene un sustrato-proluminiscente específico de caspasa 3 (el tetrapeptido DVED) en un reactivo optimizado para la actividad de caspasa, la lisis celular y la actividad luciferasa. Una vez se produce el procesamiento del sustrato-luciferasa por la caspasa, el resultado es la producción de un señal de luminiscencia proporcional a la cantidad de actividad caspasa presente en la muestra.

### 6.6- Determinación de la actividad NF-κB

La actividad del factor de transcripción NF-κB se determinó mediante el ensayo por ELISA *NF-κB (p65) Transcription Factor Assay Kit* (#10007889, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Se determinó la activación de NF-κB en muestras de hígado de ratones sometidos al modelo crónico de daño hepático a partir de 10 µl de proteína nuclear (duplicado) extraídas utilizando el kit *Nuclear Extraction kit* (Millipore). Se determinó el grado de unión al ADN de la subunidad p65 del NF-κB por espectrometría a una longitud de onda de 450 nm (Fluostar, Optima).

### 6.7- Detección de 4-hidroxinonenal (4-HNE)

La oxidación de los lípidos a causa de los radicales libres generados por el incremento de estrés oxidativo en el daño hepático se determinó a partir de 4-hidroxinonenal (4-HNE). Tanto 4-HNE como el malondilaldehído (MDA) son complejos estables muy reactivos generados como productos secundarios de la oxidación de lípidos. 4-HNE y MDA son capaces de unirse a proteínas y formar aductos estables que se pueden considerar productos finales en la oxidación de lípidos.

Se homogeniza 50 mg de hígado en una solución de PBS (Premixed PBS Buffer, Roche), inhibidores de proteasas (Complete Mini Inhibitor Cocktail Tablets, Roche) y 0.005% hidroxitolueno butilado (BHT, Sigma). La proteína total fue determinada utilizando el kit de MicroBCA™ utilizando una dilución 1/300 de las muestras, seguidamente se realizaron diluciones de las muestras a una concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de proteína. Se determinó el contenido de 4-HNE en 100  $\mu\text{L}$  de muestras en duplicado mediante el kit ELISA *OxiSelect™ HNE Adduct ELISA* (STA-338, Cell Biolabs).

### 6.8-Contenido de hidroxiprolina

La hidroxiprolina es un aminoácido muy característico del colágeno junto con la hidroxilisina, por ello su cuantificación sirve para determinar el contenido de colágeno en tejido. La cuantificación de la 4-hidroxiprolina se realiza a partir de la liberación de la hidroxiprolina a partir de una hidrólisis ácida de tejidos homogenados. La hidroxiprolina libre se oxida con la T-Cloramina para formar un compuesto del tipo pirroleno, al añadir el agente DMBA se forma un cromóforo fácilmente cuantificable por espectrometría a una longitud de onda de 560 nm (Fluostar, Optima).

- Se homogeniza 50 mg de hígado en 250  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  utilizando un homogenador tipo Dounce o mini-émbolo (Pellet pestles and cordless motor, Sigma).
- Seguidamente se transfiere el homogenado del eppendorf a un criotubo y se añade 250  $\mu\text{L}$  de HCl 37% o 12N, se vortea.
- Incubar en una estufa a 110°C durante toda la noche.
- Se dejan enfriar los criotubos y se transfiere el contenido a un eppendorf. Centrifugar durante 10min 12000g a 4°C.
- Transferir 10  $\mu\text{L}$  del sobrenadante en pocillos de una placa de 96 por duplicado (*no recoger restos de tejido oscuro*)
- Las muestras junto con de la recta patrón por (10  $\mu\text{L}$  por duplicado de 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) se evaporan en una estufa a 60°C durante 1h.

El contenido de hidroxiprolina hepática fue determinado utilizando el kit de *Hydroxyproline Colorimetric Assay* (K555-100, Bio Vision, San Francisco, CA). Los valores de hidroxirpolina fueron normalizados por la cantidad de hígado pesado para cada muestra.

## 7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los resultados numéricos se realizó mediante el software GraphPad Prism (GraphPad Software for Science Inc., San Diego, CA). Se realizó el análisis de la varianza mediante ANOVA de una o dos colas o el test t de Student de dos colas. Los resultados han sido expresados como la media  $\pm$  error estándar y las diferencias se consideraron significativas a  $P < 0.05$ .

## **ANEXO III: Otras publicaciones**

---



Otras publicaciones durante la tesis doctoral:

- López-Vicario C, González-Pérez A, Rius B, **Morán-Salvador E**, García-Alonso V, Lozano JJ, Bataller R, Cofán M, Kang JX, Arroyo V, Claria J and Titos E. A Regulatory Loop Between Desaturases and Omega-3 Fatty Acids Plays a Major Role in Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Gut* 2013 [Epub ahead of print]

-Rius B, López-Vicario C, González-Pérez A, **Morán-Salvador E**, García-Alonso V, Clària J, Titos E. Resolution of inflammation in obesity-induced liver disease. *Front Immunol*. 2012;3:257.

- Titos E, Rius B, González-Pérez A, López-Vicario C, **Morán-Salvador E**, Martínez-Clemente M, Arroyo V and Clària J. Resolvin D1 and its Precursor Docosahexaenoic Acid Promote Resolution of Adipose Tissue Inflammation by Eliciting Macrophage Polarization toward a M2-like Phenotype. *J Immunol*. 2011; 187: 5408-18

- Martínez-Clemente M, Ferré N, Titos E, Horrillo R, González-Pérez A, **Morán-Salvador E**, López-Vicario C, Miquel R, Arroyo V, Funk CD, Clària J. Disruption of the 12/15-lipoxygenase gene (Alox15) protects hyperlipidemic mice from nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2010; 52:1980-91.

- Horrillo R, González-Pérez A, Martínez-Clemente M, López-Parra M, Ferré N, Titos E, **Morán-Salvador E**, Arroyo V, Clària J. 5-lipoxygenase activating protein signals adipose tissue inflammation and lipid dysfunction in experimental obesity. *J Immunol* 2010; 184:3978-87

- Martínez-Clemente M, Ferré N, González-Pérez A, López-Parra M, Horrillo R, Titos E, **Morán-Salvador E**, Planagumà A, Miquel R, Arroyo V, Funk CD, Clària J. 5-Lipoxygenase Deficiency Reduces Hepatic Inflammation and TNF $\alpha$ -induced Hepatocyte Damage in ApoE-null Mice. *Hepatology* 2010; 51:817-27.

- González-Pérez A, Horrillo R, Ferré N, Gronert K, Dong B, **Morán-Salvador E**, Titos E, Martínez-Clemente M, López-Parra M, Arroyo V, Claria J. Obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis are alleviated by omega-3 fatty acids. A role for Resolvins and Protectins. *FASEB J* 2009; 23: 1946-57.

- Clària J, Horrillo R, Martínez-Clemente M, **Morán-Salvador E**, Titos E, González-Pérez A, Ferré N. Mecanismos básicos de lesión hepatocelular. Papel de los mediadores lipídicos de inflamación. *Gastroenterol Hepatol* 2008; 31:682-692.



## **ANEXO IV: Presentaciones en congresos**

---





Los resultados de la tesis doctoral han sido presentados en los siguientes congresos:

- 5<sup>th</sup> European Club for Liver Cell Biology-Meeting. Spier, The Netherlands, September 27<sup>th</sup>-29<sup>th</sup>, 2012. Liver cell-specific deletion of PPAR $\gamma$  establishes anti-inflammatory and anti-fibrogenic properties for this nuclear receptor in Kupffer cells. E. Morán-Salvador, E. Titos, A. González-Pérez, B. Rius, V. García-Alonso, C. López-Vicario, R. Miquel, Y. Barak, V. Arroyo, J. Clària. *Comunicación Oral*.

- The International Liver Congress<sup>TM</sup>C 2012 of the 47<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL). Barcelona, Spain, April 18<sup>th</sup>-22<sup>nd</sup>, 2012. Liver cell-specific PPAR $\gamma$  conditional-null mice establish anti-inflammatory and anti-fibrogenic properties for this nuclear receptor in Kupffer cells. E. Morán-Salvador, E. Titos, A. González-Pérez, B. Rius, V. García-Alonso, C. López-Vicario, R. Miquel, Y. Barak, V. Arroyo, J. Clària. *Comunicación Oral*.

- XXXVII Congreso de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH). Madrid, Spain, February 15<sup>th</sup>-17<sup>th</sup>, 2012. La eliminación selectiva de PPAR $\gamma$  en distintos tipos de células hepáticas establece propiedades anti-inflamatorias y anti-fibrogénicas para este receptor nuclear en las células de Kupffer. E. Morán-Salvador, E. Titos, A. González-Pérez, B. Rius, V. García-Alonso, C. López-Vicario, R. Miquel, Y. Barak, V. Arroyo, J. Clària. *Póster*.

- 45<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Association for the study of the liver (EASL). Vienna, Austria, April 14<sup>th</sup>-18<sup>th</sup>, 2010. Role for PPAR $\gamma$  in hepatic steatosis as determined by hepatocyte and Kupffer cell-specific conditional knockouts using Cre recombinase. E. Morán-Salvador, M. López-Parra, E. Titos, M. Martínez-Clemente, A. González-Pérez, R. Horrillo, C. López-Vicario, Y. Barak, V. Arroyo, J. Clària. *Comunicación Oral*.

- XXXV Annual Meeting of the Spanish Association for the Study of the Liver (AEEH). Madrid, Spain, February 17<sup>th</sup>-19<sup>th</sup>, 2010. Resistencia al desarrollo de esteatosis hepática en ratones knockout condicionales de PPAR $\gamma$  específicos de hepatocito. E. Morán-Salvador, M. López-Parra, E. Titos, M. Martínez-Clemente, A. González-Pérez, R. Horrillo, C. López-Vicario, Y. Barak, V. Arroyo, J. Clària. *Comunicación Oral*.



Bé, PER FIIIIII!!!! (calia dir-ho) Ja ha arribat el moment d'escriure l'apartat d'agraïments, mira que durant tots aquests anys sempre pensava en aquest punt i que seria el que menys em costaria, però s'ha quedat l'últim per rematar aquesta etapa ja que és molt difícil expressar tot el que he sentit en quasi 6 anys i sense oblidar-me a ningú! Espero haver-me enrecordat de tothom que m'ha acompanyat en aquest llarg camí (si us plau, si algú no apareix no ha sigut amb mala intenció...realment he anat perdent memòria durant aquests anys de la tesi :P ).

Primer de tot cal ser protocolari ja que s'ha de tenir en compte que aquesta tesi no hagués sigut possible sense el suport monetari que he tingut per part de l'Estat gràcies a la beca FPU y el SAF (quan tot "funcionava relativament bé" i encara creien una miqueta en la ciència), i el suport institucional del Servei de Bioquímica i Genètica Molecular de l'Hospital Clínic de Barcelona, l'Universitat de Barcelona i l'IDIBAPS. Aquesta part institucional en el cas de la meua tesi ha estat present durant aquests 6 anys d'una forma o altra. He viscut molts bons moments treballant a les diferents instal·lacions i amb en la dinàmica/àmbient de treball que ofereix aquest eix, però no puc deixar passar el que també m'ha ensenyat aquesta "empresa" amb les jerarquies, els problemes administratius, burocràtics i polítics.

Haver realitzat la tesi m'ha permès créixer com a persona, tant a nivell professional amb tots els coneixements científics i metodològics com a nivell personal. Crec que la tesi no ha sigut només una part de la meua carrera científica ja que aquests 6 anys també he viscut una muntanya rusa de sentiments i relacions personals de les que he après moltíssim. Per això totes aquelles persones que m'heu donat suport i aguantat durant aquest temps heu fet possible també que aquest treball s'hagi realitzat. És un "topicazo" però certament aquesta tesi no hagués sigut possible sense la vostra ajuda.

En primer lloc vull agrair al meu director de tesi el Dr. Joan Clària per donar-me l'oportunitat d'haver realitzat la tesi al seu grup de recerca. Gràcies per transmetre'ns tal i com ho fas la teua passió per la ciència i mostrar-nos diàriament com és el món científic. Joan moltes gràcies pel teu esforç, dedicació, consells, ajuda i confiança amb aquest llarg projecte i sobretot amb la meua persona (que a vegades no he sigut fàcil de portar...).

A tot els companys de recerca que han esdevingut amics i tenen un protagonisme especial en la realització d'aquesta tesi tan sols els puc repetir el que ja saben, vosaltres heu fet possible que aquesta tesi s'hagi materialitzat. Gràcies per estar al meu costat compartint el meu dia a dia, aguantant els moments dolents amb plors, rallades, indignacions, cabrejos i malestars però també les alegries, victòries, rialles, ironies, bogeries i celebracions.

Sobretot als meus companys de grup, conegut com els Clàrias, els vull agrair per tot el que he comentat anteriorment però també pel seu suport logístic, científic i tècnic. Gràcies a totes les persones que formen actualment part del grup les quals m'estimo molt i els dono molts ànims per continuar i finalitzar, la Vero que sempre la recordaré per la seva innocència però també per ser un sac de nervis i la Cris per la seva perseverància i dolçor (junt es feia un gran equip), la Bibi, l'Esther i

la nova incorporació l'Artiz (necesitabamos esa compensación masculina y nos has dado equilibrio, tranquilidad, grandes ideas y comentarios, gracias!!! a por todas y para adelante, exprime Barcelona al máximo y te deseo lo mejor en esta etapa que has iniciado en el grupo...y grandes éxitos!! :P). I a tots els meus companys que ja han marxat però que han compartit amb mi la meitat d'aquest trajecte i per mi sempre estan presents: la Natalia, la Marta, la Raquel, en Marcos i l'Ana. En particular vull donar-li mil gràcies a les meves mentores: l'Esther que ha sigut una referència y la meva mami a la ciència (gràcies per estar al meu costat sempre, ser incondicional i donar-me tants bons consells i ajuda en tot); i la Marta per sempre ser tan generosa, amable, carinyosa, irònica i ajudar-me en els inicis que van ser molts durs (gracias porque has sido irremplazable, por apoyarme y enseñarme tantas cosas que ha día de hoy realizo en el lab, siempre estaras presente). També vull enrecordar-me dels meus inicis al laboratori 502 que al ser tan petit va aconseguir que ens coneguéssim tots més profundament i treballéssim com un gran equip: la Natalia, que podia amb tot i arrasava per allà on passava (suposo que continues igual per Reus), la Raquel per ser sempre una gran científica, boníssima companya, amiga i mestra en donar opinions i consells, el Marcos pel seu optimisme que jo sempre esperava per aixecar-me els ànims. Gràcies de tot cor a les meves companyes de viatge al CEK, la dolceta Anitín que ha viscut tota aquesta tesis menys l'etapa final però sempre radiant simpatia, carinyo, suport incondicional en tots els moments dolents i bons, i ajudant-me a la distància amb el papeleo; i a la Bibiot (que li he deixat a càrrec del nostre amic Murphy però segur que ho farà amb millor humor :P) gràcies per ser tan boja, donar-me carinyo, fer-me riure, ajudar-me i escoltar-me taaant, apart de fer-me una mica de cas el lab i compartir les estonetes de cafè/té, ja saps que em tindras pel que faci falta en la distancia.

No em puc oblidar de tot el grup dels "Wladis" i "los Manueles" amb els que he compartit el plaer d'estar apinyats al laboratori 502 (conegut com laboratori "patera") però en el que hem passat molts bons moments, i que després al CEK els he trobat a faltar per la distància que ens separa a la tercera planta. La Sònia amb la seva vitalitat i amor per la ciència, responsable de tots els sobrenoms que encara perduren tot i haver marxat fa temps, el Javi amb les seves entrades i sortides i anècdotes vàries, el Pedrín rondinant però també compartint consells i escoltant al personal, i la Vedri companya de generació doctoral, sempre lluitant i oferint un somriure al seu voltant. No vull oblidar a les incorporacions més tardanes amb els que he viscut l'última etapa al CEK: la Denise tan calladeta però sorprenent quan la coneixes, el Santi característic per tenir les idees tan clares i al Jon que ha sigut com un aire fresc aportant idees a tothom, mostrant que hi ha possibilitats de tot tipus (gracias también por tu optimismo, saber hacer, consejos científicos y personales pero sobretodo por tu compañerismo). Vull fer una menció especial als meus companys de quinta de tesis: el George que sense ell el nostre entorn no seria el mateix (moooltes gràcies per ser tan autèntic, per les teves manies característiques, les teves idees i comentaris, i per haver compartit amb mi algun concert :P) i la Mongeta que ha sigut un gran suport en tot aquest camí que hem compartit juntes primer al Idibaps i ara al CEK (vam començar juntes i llegim juntes, has sigut una gran amiga i sempre et trindré present per la teva sensibilitat, amistat, sociabilitat, i suport; gràcies per haver-me escoltat tant a Bcn com a NY i ajudar-me amb tots els problemes professionals i personals...saps que em tens pel que faci falta).

Bé que seria aquesta tesi sense la presència d'aquest grup tan característic com es "els Bataller" i ara també "Pau Sancho". El nostre i el vostres grup sempre han sigut companys i germans de laboratori tant al IDIBAPS com al CEK, sempre col·laborant i ajudant-nos en qualsevol cosa del

laboratori. Vull donar agraïments en especial al Ramón Bataller per ser tan pròxim, fer-nos riure amb les seves historietes i per donar-me suport quan li he demanat. Gràcies també al Pau per ser com un amic i pels consells que m'has donat. Gràcies als antics components que ens van haver de suportar entrant i sortint del seu lab cada vegada que imprimíem: el Jordi, la Montse Moreno, la Marlene, el Jose, el Javi i l'Elena. I gràcies també als nous pel seu suport i ànims: la Mar "dolçeta a més no poder", la Isabel "cul inquiet", la Valèria i a la nova incorporació el Luis, als dos molta sort amb la tesi. Però sobretot als meus grans amics més que companys que animen cada dia el personal i es fan notar en tota la planta: l'Uri, la Silvia, la Cristina Millán, la Dèlia i el Dani. Cadascun de vosaltres us mereixeu un raconet al meu cor i he tingut el plaer de passar molt temps d'oci amb vosaltres. Gràcies Dani per ser com diu la Dèlia com un "pitufin gruñón" però sempre amb el teus comentaris als moments adequats i per ser tan bon company i amic. Siliiiiiiii "mi amore", gracias por ser tan espontánea, sensible, divertida, gran amiga, confidente y compañera, eres una gran científica y espero que nuestros caminos se crucen en el futuro, nos vemos en NY!!! Uriii que puc dir-te, si ets el meu company de viatge ja a Viena i en tota aquesta etapa al CEK, ens em donat ànims mutuament, carinyo, consells científics i personals, però sobretot molt amor, saps que tens una gran amiga i sempre t'esperaré allà on sigui amb els braços oberts o disposada a tornar a viure amb tu!(...potser en un futur a Londres?? ☺). Bueno y que decir de mi dúo favorito: C. Millán y Delia. Gracias mis amores por compartir todas esas tardes y noches de birroterapias, escapadas, salidas, cenas, paseos y pelis. Habéis sido un gran apoyo en esta segunda mitad de la tesis, os agradezco de todo corazón vuestros consejos, puntos de vista y sobretodo vuestro cariño...gracias por animarme en todo lo personal y profesional. Cris me alegro tanto de haber compartido contigo muchos momentos en NY, espero que continúes siendo tan espontanea y centrada, continúes haciendonos reir con tus locuras pero que nos des un poco de tu estado "zhen"(ya sabes..."Camina hacia la luz pequeña C Millán" ☺). Mi pareja de hecho Delia, me ha encantado haberte encontrado y compartir tantísimas cosas, parecemos tanto en algunas cositas pero también compensandonos en otros aspectos, eres grande como persona, me encanta tu gracia característica y tu sensibilidad, gracias por ayudarme, escucharme, asesorarme en cine y hacerme reír tantísimo...si es que las clavas amore!!! Espero continuar manteniendo esta amistad durante mucho tiempo porque realmente os echaré de menos!

Bé i com no, aquesta tesi es mereix una menció especial a la Pepa!!!! La nostra labmanager al CEK però que al IDIBAPS/Hospital ja apuntava maneres ☺ Pepa ja saps que tenim molta confiança i ens coneixem bé, a vegades em xocat de caràcter però et tinc un grandíssim apreci. Gràcies per ajudar-nos en tot i més, per tenir tanta paciència amb tothom en comandes i problemes, per buscar les solucions a tot, per ensenyar-nos el que és treballar correctament però sobretot per ser com ets!

Per descomptat vull agrair a tot el personal tècnic de la Secció de Bioquímica i Genètica Molecular per les converses compartides i les carmanyoles al despatxet, però sobretot per les mirades de somriure als passadissos i l'ajuda que sempre m'han ofert quan he tingut problemes al Hospital. Gràcies a l'Alba, la Lourdes, Vero, Loli, Vane i Sònias. Gràcies en especial a la Montse Bernat per estar sempre animant a tota la gent del grup, per la seva simpatia, predisposició en ajudar-nos i sobretot pels nostres intercanvis de grups musicals. L'última però la més important ha sigut l'Anabel, sempre present a l'Unitat però tot i la "llunyania" has sigut companya de tota aquesta

etapa. Anabel mooltíssimes gràcies per haver-me escoltat en moments bons i dolents, de donar-me tot tipus de suport, gràcies per ser tan bona, irònica i pròxima...espero compartir molts concerts en el futur, viatges i experiències!! "Berlín allá vamos!"

No puc oblidar-me totes aquelles persones amb les que m'he anat creuant aquests anys i que he compartit diferents etapes, moments i ocasions però amb les que sempre he intercanviat rialles, converses i consells. Gràcies als antics i nous components del laboratori 501, els "Víctors", a la Melina i l'Elisabet que espero que tot els vagi molt bé a Alemanya i UK, i a la Raquel i en Borja (espero que la producció de cervesa obri nous camins :P). Gràcies al Dani i la Mari d'UTR amb els que he rigut moltíssim compartint cultius al Hospital, trobades a l'estabulari i al CEK. I també no em puc oblidar la Loreto, el Juanma i el grup dels Panés amb els que he compartit aquesta segona meitat de la tesi al CEK, tant a la discoteca de cultius com al mini office. També vull enrecordar-me d'altres companys com la Laura Conde, Laura i l'Anna amb les que vaig compartir estones i el tour amb els trens per les estacions d' Holanda. Sobretot vull donar un agraïment en especial a l'Anna Moles, de seguida que et vaig conèixer vaig veure en tu una gran persona, amiga i companya, gràcies per ajudar-me amb tots els meus dubtes sobre el PostDoc i per donar-me tant suport en tots els sentits. I com no, la Marce!!! Aún me acuerdo cuando te visitabamos con Marta en Hormonal, siempre tan luchadora y gran científica con tu humor, consejos y ayuda para lo que hiciera falta...gracias Marce por siempre darme ánimos y preguntarme como estaba, espero que la suerte este de tu parte.

Tampoc no em puc oblidar el meu "estimat" estabulari on he passat moltes hores de la tesi, als inicis creuant els ratolins i barallant-me per trobar espais per les gàbies, i al final organitzant i reduint aquests espais. Gràcies a tot el personal de l'estabulari pel seu treball però sobretot vull agrair a la Leire per ajudar-me amb els problemes inicials amb els ratolins, al Pep per aquesta última etapa amb la criopreservació, i al Ignacio per la seva simpatia i predisposició en ajudar-nos en qualsevol cosa. També vull agrair a les noies de l'Unitat de Citòmica, la Isabel Crespo i la Cristina per ajudar-nos a entendre el mon de Citometria i Sorting.

I would like to thank all people in Plutzky's laboratory. I spent only three months in Boston but very intensive ones. I had the opportunity to work with great and smart people who exchange with me technical and scientific knowledge. Thanks a lot to Jorge to be so friendly and close, Florian to be so careful and good teacher, Hong for your technical support and Satoru to turn into good friends and labmates. Gracias a Vero y Elena por ser tan buenas amigas y hacerme sentir como en casa en Boston.

A part de totes aquestes persones que han compartit amb mi l'ambient del laboratori, cal mencionar totes les persones que formen part de la meua vida i que també han estat al meu costat durant la tesi com les "Super Masters" amb les que hem comentat cada jugada d'aquesta llarga partida: les inquietes Noe i Meri, sempre preocupades pero que podeu amb tot i més (Noe espero que acabis aviat i trobis el teu camí i Meri ja saps que ets un crack i que faràs meravelles per allà on vagis...esperem el teu Science de Detroit ☺), i la meua companya de patiments "la Quiroga", ja veus com ha costat i al final llegim al mateix moment, saps que ho donem tot i ho

celebrem amb les cerveses que calgui i on calgui (espero que continuem compartint coverses i riures allà on ens porti el destí jajajaja...) I la meva amiguíssima Míriam que saps que no t'oblido mai, que sempre em tindras allà on anem com hem fet des del primer dia de la Uni, ja veus que aquesta aventura ha sigut durilla però, i el que hem après?? (Carinyet gràcies per compartir totes les experiències que hem viscut, per ser tan lluitadora i per estar sempre al meu costat, et desitjo que el futur es presenti millor i ja veuras que en res seras la pròxima en defensar la tesi!) També agrair als amics que he conegut a Bcn i sempre m'han preguntat per la tesi el Diego, la Sam i la Pame. No puedo olvidarme de Alex con el que he compartido convivencia y me ha "soportado" estos últimos meses de estrés, gracias por darme siempre tu punto de vista y ánimos.

He d'agrair profundament el recolzament i amistat de les meves nenes de Reus amb les que he crescut i viscut totes les alegries i plors. En especial a la Laia perquè ha viscut en primera persona tot el meu pas per Bcn i amb la que he compartit moltíssimes converses, inquietuts i suport mutu. Gràcies nenites per ser cadascuna com sou, per compensar-nos tant, per les converses i vivències compartides i sobretot per donar-me tants ànims sempre. Sou "Estupeendes"!!! Laureta, Marina, Aïda i Laieta, ja sabeu que us estimo moltíssim i espero que la nostra amistat duri moltíssim!! ☺

Aquest esforç ha sigut possible gràcies a tot el suport i amor que he rebut de la meva família: els avis, tiets i cosins...que sempre esteu pendents per on paro i em pregunteu amb molt interès per aquest món científic. Gràcies en especial als meus tiets Carme i Ferran per acollir-me a casa vostra el primer any de màster i ser com uns segons pares a Bcn. I en extensió gràcies a tu Mariona per haver sigut com una germana a Bcn tant l'època que vam viure juntes com ara que estem separades, sempre amb el teu optimisme, les teves idees i els nostres moments de festa, gràcies cosineta. Per últim però no els menys importants la meva "family" ja que sense ells això no s'hagués materialitzat aquesta tesi. Pare meu gràcies per la teva paciència, calma i sàvies opinions; Mareta ets la més lluitadora, carinyosa i sempre has estat al meu costat ajudant-me en tot i preocupada per mi; i la meva inyu Siiiiilv gràcies per soportar les meves indecisions, ser tan esborrajada, animar-me i compartir la teva vida amb mi, saps que la teva opinió és molt important ☺, gràcies per fer més gran la nostra família amb els meus estimats Gerard i Ariadna. Guapets m'heu donat tot el vostre suport, els vostres consells divins i imprescindibles per mi, tot el vostre amor, valor i ànims, però sobretot m'heu escoltat i calmat en tots els meus moments d'estrès i angoixa...sou els millors i aquesta tesi és tan vostra com meva!!

Vull finalitzar aquests agraïment amb un punt d'ironia i sarcasme, durant aquesta tesi he tingut un gran company de viatge que ha sigut el meu bon amic Murphy...a uns quants companys també els ha visitat i altres han sigut més afortunats sense la seva presència, però jo tinc clar que tot i haver patit problemes en els moments menys adequats i tots sempre acumulats, he pogut aprendre moltíssim de tots ells. Així que inicio una nova etapa on espero poder solucionar tot allò que vingui ara ja si "amb més tranquil·litat"!!!!

## **Lo que te hace grande- Vetusta Morla (Mapas, 2011)**

Tal vez, lo que te hace grande  
no entienda de cómo y por qué.  
Tal vez, lo insignificante  
se ha visto en un barco de nuez.

Tal vez, lo que te hace grande  
no sea difícil de ver.  
Tal vez, cada guiño esconda  
la llave que intentas tener.

Ya ves, se nos queda grande  
y hay riesgo de alarma otra vez.  
Tal vez, cuando todo amaine  
la suerte nos vuelva a vencer.

Y en el vaivén de planes sin marcar  
cae sobre ti la bomba universal;  
no hay colisión, ni ley, ni gravedad  
que te pueda hacer caer aunque tiren a dar.

Tal vez, las paredes ladren  
y el techo empiece a correr,  
dirán que cayó el gigante  
y un charco se ha abierto a tus pies.

Tal vez, lo que te hace grande  
no entienda de cómo y por qué.  
Tal vez, lo que me hace grande  
es tenerte delante otra vez.

Y en el vaivén de planes sin marcar  
cae sobre ti la bomba universal;  
pero no hay colisión, ni ley, ni gravedad  
que te pueda hacer caer aunque tiren a dar.

Suena un tambor, retumba en el umbral  
viene hacia aquí, me atrae como un imán.

No sé lo qué te hace grande,  
no entiendo de cómo y por qué.

Suena un tambor, retumba en el umbral  
viene hacia aquí, me atrae como un imán.  
Pero no hay ecuación ni fórmula genial  
que te ayude a comprender lo que asoma detrás.