



CONTROL SISTÈMIC I TEIXIT-ESPECÍFIC PER RECEPTORS NUCLEARS DE LA RESISTÈNCIA A LA INSULINA INDUÏDA PER L'OBESITAT

M. del Carmen Caelles Franch

Facultat de Farmàcia - Universitat de Barcelona

Annabel Valledor Fernández

Facultat de Biologia - Universitat de Barcelona

Mercedes Ricote Pacheco

CNIC Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III – Madrid

1. Resum

Una resposta inflamatòria crònica de baix grau (coneguda com a *metaflamació*) és un factor etiològic important per a la resistència a la insulina associada a l'obesitat, tret primerenc en el desenvolupament de la diabetis de tipus 2. En conseqüència, l'activació de vies proinflamatòries per citocines inflamatòries i metabòlits lipídics interfereix en la senyalització del receptor d'insulina i afavoreix la resistència a la insulina. Els membres de les subfamílies dels receptors nuclears (NR) activats per proliferadors de peroxisomes (PPAR), del receptor X del fetge (LXR) i del receptor X de retinoides (RXR), són activats per agonistes específics i tenen un paper central en el metabolisme dels carbohidrats i dels lípids, així com en la modulació de les respostes immunes. En aquest sentit, mitjançant la seva capacitat d'interaccionar amb vies proinflamatòries, aquests NR exerceixen activitats antiinflamatòries i sensibilitzadores a la insulina que són potencialment rellevants per a les accions farmacològiques dels seus lligands; malgrat això, els mecanismes subjacents a aquestes activitats no estan del tot caracteritzats.

Per estudiar els mecanismes i accions de PPAR γ , LXR i RXR en la resistència a la insulina associada a l'obesitat, vam emprar diferents models de ratolins transgènics, que incloïen ratolins amb deficiència genètica (*knock-out*, KO) per a alguns d'aquests NR, com ara el KO específic de macròfags per a Rxr α i Rxr β (Mac-RXR-KO) o dels gens Rxr α , Rxr β i Rxr γ en cardiomiòcits adults (TKO), els KO globals d'LXR α/β -KO i PPAR γ , o per a gens diana d'aquests NR. A més, hem utilitzat models de ratolí amb resposta inflamatòria exacerbada, com ara ratolins KO per a la fosfatasa MKP-1 o ratolins transgènics amb sobreactivació condicional de la *c-Jun N-terminal Kinase* (JNK) específicament en macròfags (LysM-MKK7D) o en cèl·lules pancreàtiques secretores d'insulina (MKK7D), o models amb senyalització proinflamatòria defectuosa.

Hem demostrat que la inhibició de JNK és un tret comú d'aquests NR, i s'amplia així la llista de membres de la superfamília dels NR capaços d'interaccionar negativament amb aquesta via. Aquesta acció és important per al paper rellevant de l'activació de JNK en la resistència a la insulina associada a l'obesitat i a la diabetis de tipus 2. En aquest sentit, els nostres estudis van demostrar que l'activació constitutiva de JNK en cèl·lules secretores d'insulina bloqueja l'alliberament d'insulina postprandial i regula la resistència a la insulina local i sistèmica i la hiperinsulinèmia associades a l'obesitat.

A més, hem incrementat el coneixement sobre els mecanismes moleculars que intervenen en les accions sensibilitzadores a la insulina d'LXR i RXR. A més, estudis que exploren la rellevància de la xarxa transcripcional d'RXR en macròfags i en el cor adult revelen que aquest factor de transcripció és un regulador de la identitat de macròfags, l'homeòstasi lipídica i la inflamació en aquestes cèl·lules i en cardiomiòcits. Les nostres troballes suggereixen que en macròfags l'RXR és un factor de transcripció clau per al control de la resistència a la insulina i la malaltia cardíaca relacionada amb la resistència a la insulina.

En general, aquests estudis obren nous fronts farmacològics per tractar les condicions patològiques associades a l'obesitat i a la diabetis de tipus 2, dues grans pandèmies del nostre temps.

2. Resultats

Caracterització de nous mecanismes d'interacció entre els NR i la senyalització proinflamatòria. Implicacions en la resistència a la insulina associada a l'obesitat

Ens hem centrat en la interacció de diversos NR amb la via proinflamatòria de JNK i en les conseqüències de l'activació teixit-específica d'aquesta via en la resistència a la insulina associada a l'obesitat. Per a aquests estudis, hem utilitzat dos models de ratolí transgènic generats pel nostre grup (LysM-MKK7D i MKK7D per a l'activació de JNK en cèl·lules mieloides i β pancreàtiques, respectivament).

Prèviament, havíem demostrat que els lligands de PPAR γ , com els fàrmacs sensibilitzadors a la insulina de la família de les tiazolidinediones (TZD), inhibeixen l'activació de JNK induïda per l'obesitat. Aquesta acció és necessària per les propietats sensibilitzadores a la insulina de PPAR γ i els seus lligands. En aquest projecte, hem ampliat el coneixement en aquest camp mostrant que els LXR i RXR també són capaços d'inhibir l'activació de la via de JNK. A escala molecular, tant els agonistes de PPAR γ com d'LXR regulen l'expressió d'un candidat prometedora, la serina/treonina-fosfatasa 5C (Ppp5C). Tanmateix, els ratolins Ppp5C-KO van desenvolupar obesitat i resistència a la insulina en resposta a una dieta alta en greixos (HFD) de manera

similar als ratolins de control i, és més, van demostrar que aquesta fosfatasa no participa en les accions sensibilitzadores a la insulina dels agonistes de PPAR γ ni d'LXR. A més, hem demostrat que l'acció sensibilitzadora de la insulina de PPAR γ i els seus lligands, les TZD, no està mediada pel gen antiinflamatori MKP-1. Finalment, hem identificat un nou gen diana de PPAR γ i LXR que inhibeix l'activació de la via JNK en resposta a l'estrès de reticle endoplasmàtic i a estímuls inflamatoris i, per tant, és candidat a participar en les accions sensibilitzadores a la insulina d'aquests NR i els seus agonistes.

Amb relació a l'activació de la via proinflamatòria de JNK en teixits específics, mitjançant el model de ratolí LysM-MKK7D vam demostrar que l'activació de JNK a les cèl·lules mieloides es veu esmorteïda per la inducció concomitant d'un mecanisme de retroalimentació negativa, una resposta rellevant que s'ha de tenir en compte en futurs estudis. D'altra banda, a partir de l'estudi dels ratolins MKK7D vam demostrar que l'activació de JNK en les cèl·lules secretores d'insulina regula la resistència a la insulina sistèmica i la hiperinsulinèmia associades a l'obesitat.

Una segona línia de recerca es va centrar en la interacció entre LXR i la ruta de senyalització proinflamatòria de l'interferó gamma (IFN γ). Hem observat que el factor de transcripció *interferon regulatory factor 1* (IRF1) és necessari per a la inducció de gens inflamatoris clàssics de la resposta dels macròfags a IRF1. L'activitat d'LXR regula la inducció d'un subconjunt d'aquests gens sense interferir en l'expressió d'IRF1. Per contra, l'ús de macròfags IRF1-KO va revelar que la interacció negativa entre LXR i IRF1 és important per a la repressió d'un subconjunt de gens diana d'LXR. En contrast amb la interacció negativa general entre LXR i la senyalització inflamatòria, també hem observat que diversos mediadors inflamatoris cooperen amb LXR per a la inducció d'un subconjunt discret de gens diana d'LXR, inclòs CD38, un enzim multifuncional que regula els nivells intracel·lulars de NAD. Els mecanismes moleculars implicats en aquesta cooperació s'han caracteritzat parcialment.

Nous mecanismes implicats en les accions sensibilitzadores a la insulina dels NR

Hem caracteritzat l'impacte funcional d'RXR en la resistència a la insulina, centrant-nos en l'estudi dels teixits metabòlics i la interacció entre òrgans. Per abordar el paper d'RXR en macròfags en el control del metabolisme i la resposta inflamatòria, vam

generar el model Mac-RXR-KO i vam demostrar que RXR és un factor de transcripció necessari per al manteniment i la identitat dels macròfags residents als teixits. És més, la deficiència d'RXR α/β en macròfags provoca intolerància a la glucosa i resistència a la insulina en ratolins obesos.

També vam caracteritzar el mecanisme regulador pel qual RXR controla les respostes inflamatores en macròfags i vam concloure que RXR i PPAR γ es requereixen mútuament per a la transrepressió de gens proinflamatoris. Les nostres troballes *in vivo* confirmen que els canvis transcripcionals dependents d'RXR en els macròfags són necessaris per a l'acció sensibilitzadora a la insulina dels lligands d'RXR i PPAR γ . A més, vam demostrar que tant RXR com PPAR γ són necessaris per a la regulació transcripcional de gens rellevants per a l'homeòstasi lipídica. Per tal de caracteritzar l'estat metabòlic dels macròfags, hem fet estudis de metabolòmica en macròfags peritoneals de ratolí. Els nostres resultats demostren canvis bioquímics induïts per FACS a les cèl·lules aïllades.

Per dilucidar la contribució funcional de l'RXR cardíac en la resistència sistèmica a la insulina i la cardiomiopatia diabètica, hem combinat l'ús de models de ratolí KO, tècniques d'imatge avançades i aproximacions genòmiques. Hem demostrat que l'absència simultània dels gens Rxr α , Rxr β i Rxr γ en cardiomiòcits adults (TKO) condueix a un fenotip patològic que consisteix en una miocardiopatia dilatada juntament amb una disminució de la funció sistòlica. La manca d'anomalies quan només es van suprimir Rxr α o Rxr α -Rxr β va confirmar l'existència de redundància entre les isoformes. Tenint en compte que els pacients diabètics solen presentar una dilatació del ventricle esquerra i una reducció substancial de la fracció d'ejecció, proposem l'estudi del model TKO per descobrir mecanismes mediat per RXR en la fisiopatologia cardíaca diabètica. Hem descobert que els cors TKO desenvolupen fibrosi intersticial a causa de la regulació transcripcional de gens fibròtics (*Col1a1*, *Col1a2*, *Col6a2*, *Lox1...*) i a una disminució de la captació de glucosa avaluada mitjançant FDG PET-CT. El desordre metabòlic es va evidenciar encara més per la hiperproliferació i desorganització de l'estructura mitocondrial. El fet que l'obesitat induïda per la dieta empitjora la disfunció cardíaca en ratolins TKO va evidenciar un metabolisme lipídic defectuós com a potencial causa del trastorn. A més, hem demostrat que l'absència d'RXR en el miocardi resulta en una atenuació global de l'expressió de gens implicats en l'oxidació dels àcids grassos. Aquest fenotip transcripcional es va acompanyar

d'alteracions paral·leles en el perfil d'expressió de gens que regulen el metabolisme de la glucosa i els aminoàcids. Vam concloure que els cors TKO no eren capaços d'utilitzar adequadament els àcids grassos per generar ATP. Aquest metabolisme anormal condueix a l'oxidació de glucosa, lactat i aminoàcids per satisfer les demandes energètiques del cardiomiòcit adult. Col·lectivament, els nostres resultats proposen els RXR com a reguladors transcripcionals clau del metabolisme cel·lular amb implicacions funcionals en l'homeòstasi de la glucosa i les malalties cardíques.

D'altra banda, es va avaluar la rellevància d'un nou gen diana d'LXR en les accions sensibilitzadores a la insulina dels agonistes d'LXR en un model d'obesitat induïda per HFD. En ratolins de tipus silvestre obesos, el tractament amb un agonista d'LXR va reduir el pes corporal, va disminuir el contingut d'insulina pancreàtica i la insulinèmia basal i induïda per hiperglicèmia i va donar lloc a una millora de la sensibilitat a la insulina sistèmica, cosa que es va corroborar amb la restauració de la capacitat de múscul esquelètic per induir la fosforilació d'AKT en resposta a la insulina *in vivo*. En comparació amb els ratolins de control, els ratolins KO d'aquest nou factor presentaven nivells d'insulina sistèmics i pancreàtics més baixos i eren més intolerants a la glucosa però més sensibles a la insulina quan se sotmetien a una HFD, cosa que suggereix que tant la demanda perifèrica com el contingut d'insulina pancreàtica es reduïen. És important destacar, però, que els efectes protectors de l'agonista d'LXR sobre la sensibilitat a la insulina sistèmica i en el múscul esquelètic es van atenuar en aquests ratolins. Les accions mediades per la via d'LXR van ser consistents amb efectes predominants en els teixits diana d'insulina, incloses la reducció dels nivells de leptina i l'expressió d'un subconjunt de mediadors de la metaflamació en el teixit adipós blanc dels ratolins obesos.

3. Rellevància i possibles implicacions futures

Alguns dels resultats que hem obtingut poden afectar el tractament farmacològic actual de pacients de diabetis de tipus 2. En aquest sentit, hem demostrat que l'activació de la via proinflamatòria de la JNK a les cèl·lules secretores d'insulina bloqueja l'alliberament d'insulina postprandial i regula la resistència a la insulina sistèmica i la hiperinsulinèmia associades a l'obesitat, de manera que s'obre una nova via per pal·liar farmacològicament aquestes condicions patològiques. Segons les nostres dades, els medicaments amb activitat sensibilitzadora a la insulina serien les eines terapèutiques més efectives i recomanades per al tractament de la resistència a la insulina associada a l'obesitat i a la diabetis de tipus 2. En aquest sentit, els lligands PPAR γ , com ara les TZD, s'han aplicat a la clínica però els efectes secundaris van ser el motiu que fossin àmpliament retirades. No obstant això, actualment hi ha diversos assaigs clínics en curs i s'estan provant nous lligands d'aquest NR. En aquest projecte, hem obtingut proves que els lligands d'altres NR, com ara els d'LXR i RXR, també inhibeixen l'activació de la via JNK i mostren accions sensibilitzadores a la insulina mitjançant nous mecanismes. Per tant, els agonistes d'LXR i RXR o molècules dirigides a regular l'activitat de gens diana específics d'aquests NR poden ser eines terapèutiques alternatives per alleujar la resistència a la insulina associada a l'obesitat i la diabetis de tipus 2. En particular, la possibilitat de modular RXR amb lligands farmacològics (alguns ja en ús en la clínica, com el bexarotè) possiblement facilitarà la translació d'aquesta investigació bàsica al pacient a mitjà termini. També hem demostrat una relació causal entre la funció d'RXR i el desenvolupament de la cardiomiopatia diabètica. En definitiva, l'activació de rutes específiques d'RXR mitjançant l'administració farmacològica del bexarotè pot donar lloc a teràpies efectives per alleujar la disfunció metabòlica del cor en pacients diabètics. Els futurs experiments abordaran la idoneïtat del bexarotè com a tractament eficaç per a la fisiopatologia de la diabetis de tipus 2.

4. Bibliografía científica generada

Binek A, Rojo D, Godzien J, Rupérez FJ, Nuñez V, Jorge I, Ricote M, Vázquez J, Barbas C.

Flow cytometry has a significant impact on the cellular metabolome.

J Proteome Res, 2019; 18:169.

Casanova-Acebes M, Menéndez-Gutiérrez MP, Porcuna J, Álvarez-Errico D, Lavin Y, García A, Kobayashi S, Le Berichel J, Núñez V, Were F, Jiménez-Carretero D, Sánchez-Cabo F, Merad M, Ricote M.

RXRs control serous macrophage neonatal expansion and identity and contribute to ovarian cancer progression.

Nat Commun, 2020; 11:1655.

Font-Díaz J, Jiménez-Panizo A, Caelles C, Vivanco MM, Pérez P, Aranda A, Estébanez-Perpiñá E, Castrillo A, Ricote M, Valledor AF.

Nuclear receptors: Lipid and hormone sensors with essential roles in the control of cancer development.

Semin Cancer Biol, 2020:S1044-579X(20)30267-4.

Porcuna J, Menéndez-Gutiérrez MP, Ricote M.

Molecular control of tissue-resident macrophage identity by nuclear receptors.

Curr Opin Pharmacol, 2020; 53: 27.

Méndez-Lara KA, Letelier N, Farré N, Diarte-Añazco EMG, Nieto-Nicolau N, Rodríguez-Millán E, Santos D, Pallarès V, Escolà-Gil JC, Vázquez Del Olmo T, Lerma E, Camacho M, Casaroli-Marano RP, Valledor AF, Blanco-Vaca F, Julve J.

Nicotinamide Prevents Apolipoprotein B-Containing Lipoprotein Oxidation, Inflammation and Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice.

Antioxidants, 2020; 9:1162.

Glaría E, Letelier NA, Valledor AF.

Integrating the roles of liver X receptors in inflammation and infection: mechanisms and outcomes.

Curr Opin Pharmacol, 2020; 53:55.

Paredes A, Ricote M.

Decoding the functional role of nuclear receptors in cardiac physiology.

Revisió convidada. Enviada. Int JI of Mol Sci.

Letelier NA, Glaría E, Font-Díaz JF, Sancho J, Caelles C, Valledor AF.

Identification of a novel mechanism involved in the insulin sensitizing action of the LXR pathway.

En preparació.

Morcillo M, Bayod C, Lanuza-Masdeu J, Pulice G, Valledor AF, Caelles C.

c-Jun N-terminal kinase activation in pancreatic β -cells regulates systemic obesity-associated insulin resistance and hyperinsulinemia.

En preparació.

Paredes A, Justo-Méndez R, Jiménez-Blasco D, Contreras C, Were F, Santos R, Liang N, Sant'Anna VAR, Núñez V, Camafeita E, Metzger D, Vázquez J, Sánchez-Cabo F, Barbas C, Rupérez J, Treuter E, Bolaños JP, Enríquez JA, Ricote.

Retinoid X receptors orchestrate lipid metabolism during cardiac perinatal adaptation.

En preparació.

Comunicacions en congressos i reunions científiques

Díaz-Catalán DJ, Cavusoglu K, Bayod C, Valledor AF, Caelles C.

FEBS3+ & XL SEBBM Congress. Barcelona, octubre del 2017.

Comunicació pòster.

Díaz-Catalán DJ, Cavusoglu K, Bayod C, Valledor AF, Caelles C.

XI Jornada de Recerca Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona. Barcelona, octubre del 2018.

Comunicació pòster.

Letelier N, Apetoh L, Valledor AF.

5th Early Career Investigator's Workshop and Annual Meeting of Cost Action Mye-Euniter. Heraklion, Grècia, abril del 2018.

Comunicació pòster.

Glaría E, Matalonga J, Saura J, Valledor AF.

5th Early Career Investigator's Workshop and Annual Meeting of Cost Action Mye-Euniter. Heraklion, Grècia, abril del 2018.

Comunicació pòster.

Letelier NA, Apetoh L, Planas AM, Valledor AF.

5th European Congress of Immunology. Amsterdam, Països Baixos, setembre del 2018.

Comunicació pòster.

Glaría E, Matalonga J, Saura J, Valledor AF.

5th European Congress of Immunology. Amsterdam, Països Baixos, setembre del 2018.

Comunicació pòster.

Letelier NA, Caelles C, Valledor AF.

55th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes. Barcelona, setembre del 2019.

Comunicació pòster.

Morcillo M, Lanuza-Masdeu J, Bayod C, Pulice G, Vila C, Caelles C.

FEBS3+ & XL SEBBM Congress. Barcelona, octubre del 2017.

Comunicació pòster.

Morcillo M, Bayod C, Caelles C.

Simposium of NuRCaMeIn Early-Stage Researchers. Barcelona, octubre del 2017.

Comunicació oral.

Morcillo M, Lanuza-Masdeu J, Bayod C, Pulice G, Vila C, Caelles C.

II Congrès de Biologia, SCB. Barcelona, maig del 2018.

Comunicació oral i pòster.

Morcillo M, Lanuza-Masdeu J, Bayod C, Pulice G, Vila C, Caelles C.

XI Jornada de Recerca a la Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona. Barcelona, octubre del 2018.

Comunicació oral i pòster.

Morcillo M, Lanuza-Masdeu J, Bayod C, Pulice G, Vila C, Caelles C.
3rd Biomed PhD Day, Universitat de Barcelona. Barcelona, gener del 2019.
Comunicació oral.

Morcillo M, Caelles C.
18th METNET Meeting. Barcelona, febrer del 2020.
Conferència convidada.

Paredes A, Núñez V, Ricote M.
XL SEBBM Congress. Barcelona, octubre del 2017.
Comunicació pòster.

Paredes A, Núñez V, Ricote M.
1st Symposium of NuRCaMeIn Early-Stage Researchers. Barcelona, octubre del 2017.
Comunicació oral.

Paredes A, Núñez V, Ricote M.
CNIC Scientific Retreat. Madrid, novembre del 2017.
Comunicació pòster.

Paredes A, Núñez V, Ricote M.
MOIR Symposium. Universidad Rey Juan Carlos. Madrid, novembre del 2018.
Comunicació oral.

Paredes A, Sant'Anna VAR, Jiménez-Blasco D, Núñez V, Metzger D, Barbas C, Bolaños JP, Rupérez J, Ricote M.
EMBO Workshop: Organ Crosstalk in energy balance and metabolic disease.
Chiclana de la Frontera, Cadis, abril del 2019.
Comunicació oral i pòster.

Paredes A, Sant'Anna VAR, Jiménez-Blasco D, Were F, Cussó L, Núñez V, Metzger D, Desco M, Sánchez-Cabo F, Barbas C, Ruperez FJ, Bolaños JP, Ricote M.
FEBS Advanced Lecture Course Epigenomics, Nuclear Receptors and Disease. Spetses, Grècia, agost del 2019.
Comunicació pòster. Premi al millor pòster.

Paredes A, Sant'Anna VAR, Jiménez-Blasco D, Were F, Cussó L, Núñez V, Metzger D, Desco M, Sánchez-Cabo F, Barbas C, Ruperez FJ, Bolaños JP, Ricote M.

CNIC Conference 2019: New concepts in age-related cardiovascular disease. Madrid, octubre del 2019.

Comunicació oral i pòster.

Porcuna J, Menéndez-Gutiérrez MP, Ricote M.

6th Symposium on Biomedical Research. Advances and Perspectives in Molecular Endocrinology. UAM, Facultat de Medicina. Madrid, maig del 2019.

Comunicació pòster.

Tesis doctorals

Laura Alonso-Herranz.

Novel mechanisms underlying macrophage contribution to cardiac injury after myocardial infarction.

Universidad Autónoma de Madrid.

Supervisor: M. Ricote.

Melisa Morcillo.

A novel role of the c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) in obesity-associated insulin resistance.

Universitat de Barcelona.

Supervisor: C. Caelles.

Carles Bayod.

Nuclear receptors and c-Jun NH₂-terminal kinase: Crosstalk and actions.

Universitat de Barcelona.

Supervisor: C. Caelles.

José María Carbó.

Papel del receptor nuclear LXR en la proliferación y perfil metastático de células tumorales y en la actividad de macrófagos asociados a tumores.

Universitat de Barcelona.

Supervisor: A. F. Villedor

Estibaliz Glaría.

Selective effects of Liver X Receptor activation in host-bacteria interaction.

Universitat de Barcelona.

Supervisor: A. F. Valledor

Nicole A. Letelier.

Mechanisms of LXR-mediated control of obesity-induced metaflammation and insulin resistance.

Universitat de Barcelona.

Supervisors: A. F. Valledor i C. Caelles.

Ana Paredes.

Retinoid X Receptors are essential regulators of cardiac metabolism.

Universidad Autónoma de Madrid.

Supervisor: M. Ricote.