

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA**

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II



**LIPOATROFIA MARRÓN, OBESIDAD Y DAÑO VASCULAR :
MECANISMOS MOLECULARES DE RESISTENCIA A LA
INSULINA EN CÉLULAS CARDIOVASCULARES**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Yolanda Fernández Otero

Bajo la dirección de los doctores
Manuel Benito de las Heras
Almudena Gómez Hernández

Madrid, 2011

ISBN: 978-84-695-0743-8

©Yolanda Fernández Otero, 2010



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DPTO. DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR II

Lipoatrofia marrón, obesidad y daño vascular.

Mecanismos moleculares de resistencia a la insulina en
células cardiovasculares

Tesis doctoral

Yolanda Fernández Otero

Madrid, 2010



El trabajo recogido en la siguiente memoria ha sido realizado por Yolanda Fernández Otero bajo la dirección de los Dres. D. Manuel Benito de las Heras y Dña. Almudena Gómez Hernández, en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Facultad de Farmacia.

Opta al grado de Doctor

Yolanda Fernández Otero

Vº Bº de los Directores de Tesis

Dr. Manuel Benito de las Heras Dra. Almudena Gómez Hernández

Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación del Fondo de Investigación Europeo y del Ministerio de Ciencia e Innovación mediante la concesión de una beca predoctoral asociada al proyecto SAF2004-05545-C02-01, así como a la financiación de dicho Ministerio mediante los proyectos SAF2005-00014, SAF2007-60058 y SAF2008-00031; de la Comunidad de Madrid/Universidad Complutense de Madrid CAM/UCM 920384 (grupos de investigación UCM) y del Centro de Investigaciones Biomédicas en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM) dependiente del Ministerio de Ciencia e Innovación, del Instituto de Salud Carlos III y del Fondo Europeo de Desarrollo Regional.

*Hay una fuerza motriz más potente
que el vapor, la electricidad y la
energía atómica: la voluntad.*

Albert Einstein (1879-1955)

*Al carro de la cultura española le
falta la rueda de la ciencia.*

Santiago Ramón y Cajal
(1852-1934)

A mis padres

Agradecimientos

Según la Real Academia Española de la Lengua, agradecer es el hecho de mostrar gratitud o dar gracias, y no es nada fácil pues han sido muchos años de trabajo y vivencias compartidas. Si me olvido de alguien, pido disculpas.

Ante todo, quiero agradecer a Manuel Benito la oportunidad que me brindó cuando me ofreció la beca con la que empezó todo. Gracias a Manuel no sólo he aprendido de ciencia, sino también mano izquierda, gestión de un laboratorio, a seguir para adelante cuando las circunstancias no son propicias... en fin, él fue quien puso la semilla de esta tesis.

Por supuesto, también dar las gracias a Almudena, la otra responsable de esta tesis. Almu, sin ti no hubiera podido llegar este momento, nunca podré agradecértelo bastante. Gracias por tu paciencia, por tu tranquilidad (¡ojalá se me haya pegado algo!), por tus conocimientos, por tus ideas, por tu apoyo... en definitiva, gracias por todo.

Cómo no, gracias a todos los compañeros del laboratorio, ya sea el 15, el 26 ó el 21 (tantas mudanzas...). Del 15 inicial, Carmencita, mi loca con un corazón enorme, Guedi, quien me acogió como una chica del "equipo" más y me mostró lo que era el glamour de Madrid. Ángela, la auténtica "jefa" del laboratorio, siempre pendiente de que nadie estuviera de brazos cruzados y gracias a la que aprendí un montón de técnicas. Mención especial para Almudena Porras, sin ella no existirían los cardiomiocitos de este trabajo, gracias por atenderme siempre que tuve alguna duda. Gracias a Álvaro, no sólo compañero de laboratorio, sino además un gran amigo, imposible no recordar todos los momentos que pasamos juntos y espero que en el futuro haya muchos más. Y a María, la benjamina, la chica hiperactiva y despistada, ¡un placer conocerte!

Gracias a Óscar, mi *sensei* de los primeros tiempos, ¡el pobre no sabía lo que se le venía encima! Aunque al principio nos costó, con el tiempo conseguimos ponernos de acuerdo. Muchas gracias por todo Osquitar!

Gema y Sylvia, mis técnicas favoritas. Gracias chicas por toda vuestra ayuda y todos los geles de acrilamida, ¡que no fueron pocos! Y a Rebeca, la técnico "adoptada". Gracias también a Carlos, Alberto Bartolomé, Bea y Liliana, sin vosotros el laboratorio no sería lo mismo.

Gracias al laboratorio de Cáncer. A Alberto, por tu ayuda, por ser mi académico de la lengua particular, por tu amistad. A Crisfri y Palo, por los cigarros (activos o pasivos), por nuestras charlas y los ratitos al sol, ¡sois geniales chicas!

A mi “vecina de enfrente” Elisa, gracias por estar ahí cada vez que necesité “un poco de sal”, siempre con una sonrisa contagiosa.

Muchas gracias a las chicas del laboratorio 23, Sonia, Iria, Lucía, María, Elena, Ana, Loa y por supuesto a Rocío. El laboratorio más alegre de todo el departamento. Si tenías un mal día sólo era necesario salir al pasillo y oír las carcajadas procedentes del 23 para animarte.

Gracias también a todos los compañeros, profesores y becarios del departamento, todos habéis participado en esta tesis de una forma u otra. Marga, Arantxa y sus chicas, Ami y Dora; César, el hombre tranquilo; a Pilar Iniesta y las nuevas chicas de cáncer, Fernando, Esther, Juan, Pili González, a Jose Manuel... En fin ¡muchas gracias a todos!

De mi estancia en Nashville, gracias a Owen, un jefe genial; Carlo, el maestro de la cirugía; T.A, Kim, Lian-Li, Bing y todo el personal del departamento de fisiología molecular y del MMPC. Ha sido un placer trabajar con vosotros. Y fuera de Vanderbilt, a Itziar por acogerme a mi llegada y mostrarme los secretos de Nashville.

Y por supuesto, aparte de mis compañeros de trabajo, también ha habido muchas personas que me han apoyado y han conseguido que no perdiera el equilibrio ni la salud mental con “esto de la ciencia”, ya sea en el día a día o desde las lluviosas tierras astures. Gracias a Ana, por tu amistad y por facilitar mi llegada a Madrid. A Bárbara, por los ánimos diarios, la terapia mutua, por los buenos momentos. Además de mis amigas habéis sido mi familia. A Marta, Juanqui y Sara, la fórmula perfecta para desconectar, ¡cuántas historias para recordar! A mis patrocinadores, profesores de inglés y sobre todo amigos, The Public House crew: Luke, Frank, Rafa y Thomas. Me enseñasteis que el idioma no es problema si queremos comunicarnos. A mis “chicas de Farmacia”, Eva, Chou y María, unas grandes amigas.

Gracias a Paloma y David, a mi pequeño Andrés, a Alberto por esos cafés a distancia, a Dani que desde el principio se empeñó en que siguiera en ciencia; a María, a Rebe, ¡cuánto ha llovido desde los tiempos de fisio! Gracias por estar ahí.

Pero muy especialmente, muchas gracias a mi familia por el apoyo incondicional sin preguntas y sin reproches. A Fany y Diego, a mis abuelas. A mi abuelo Nicolás, me enseñaste lo que son las ganas de vivir y de luchar, nunca te olvidaré. Y a mis padres, un ejemplo de lucha diaria y de amor, siempre apoyándome al 100% y haciéndome la vida más fácil, sin vuestra ayuda nada de esto habría sido posible. Llegados a este punto, solo puedo deciros muchas gracias. Esta tesis es vuestra.

Lista de Abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

ACC	Acetil-Co A carboxilasa
ACh	Acetilcolina
AMPK	Proteína quinasa dependiente de AMP
Ang II	Angiotensina II
Apo E ^{-/-}	Ratones carentes de la apolipoproteína E
BAT	Tejido adiposo marrón
BATIRKO	Ratón carente (KO) del receptor de insulina (IR) en el tejido adiposo marrón (BAT)
BATIRKO HFD H	Grupo de ratones BATIRKO sometido a dieta rica en grasas e hiperinsulinémico
BATIRKO HFD N	Grupo de ratones BATIRKO sometido a dieta rica en grasas y normoinsulinémico
cHDL	Fracción de colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL)
cLDL	Fracción de colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL)
CM	Cardiomiocitos
CMLV	Células de Músculo Liso Vascular
CM/CMLV IR LoxP	Cardiomiocitos/ Células de músculo liso vascular con el receptor de insulina flanqueado por secuencias LoxP
CM/CMLV IRKO	Cardiomiocitos/ Células de músculo liso vascular carentes del receptor de insulina
CM/CMLV Rec A/B	Cardiomiocitos/ Células de músculo liso vascular reconstituidas con la isoforma A ó B del receptor de insulina
CM/CMLV WT	Cardiomiocitos/ Células de músculo liso vascular <i>wild type</i>
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
ET-1	Endotelina-1
Gpx-1/4	Glutation peroxidasa-1/4
HFD	Dieta rica en grasas
HSL	Lipasa sensible a hormonas
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular-1
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible

IR	Receptor de Insulina
MCP-1	Proteína quimioattractante de monocitos-1
NO	Óxido nítrico
NOX-4	NADPH oxigenasa -4
O ₂ ⁻	Anión superóxido
PAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno-1
PE	Fenilefrina
PI-3K	Fosfatidilinositol- 3 quinasa
PKC	Proteína quinasa C
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SNP	Nitroprusiato sódico
SOD-2	Superóxido dismutasa-2
STD	Dieta estándar
TGDs	Triglicéridos
TNF- α	Factor necrótico tumoral- α
TNFR1/2	Receptor de TNF- α 1/ 2
TnT	Troponina T
TxA ₂	Tromboxano A ₂
WAT	Tejido adiposo blanco

Índice

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1. RESISTENCIA A LA INSULINA	6
1.1. Modelos de resistencia a la insulina	6
1.2. Modelos animales carentes del receptor de insulina de forma específica de tejido (IRKO)	8
1.3 Modelo BATIRKO	10
2. SÍNDROME METABÓLICO	12
3. DIABETES TIPO 2	13
4. ATEROSCLEROSIS	14
4.1. Disfunción endotelial y formación de la estría grasa	15
4.2. Progresión de la lesión	16
4.3 Rotura de la placa y trombosis	18
4.4. Moléculas implicadas en la disfunción vascular	20
4.4.1. Óxido nítrico	20
4.4.2. Endotelina-1	22
4.4.3. Angiotensina II	23
4.4.4. Moléculas de adhesión	24
4.5. Moléculas implicadas en el proceso de inflamación	28
4.5.1. Las citoquinas	28
4.5.2. Las quimioquinas	30
4.5.3. Los prostanoïdes. El tromboxano A2	31
4.5.4. Las especies reactivas de oxígenos (ROS)	33
4.5.5. El factor inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1)	34
5. RESISTENCIA A LA INSULINA Y DAÑO VASCULAR	36
6. RESISTENCIA A LA INSULINA Y DAÑO CARDÍACO	37
7. OBESIDAD Y DAÑO CARDIOVASCULAR	41
8. TEJIDO ADIPOSO Y SU IMPLICACIÓN EN DIABETES	42
8.1. Tejido adiposo blanco	44
8.2. Tejido adiposo marrón	46

9. PROTEÍNAS DESACOPLANTES (UCPs) Y DIABETES	48
10. ENVEJECIMIENTO, RESISTENCIA A LA INSULINA Y DAÑO CARDIOVASCULAR	50
OBJETIVOS	52
MATERIALES Y MÉTODOS	
1. ESTUDIOS EN LOS MODELOS EXPERIMENTALES	53
1.1. Diseño del modelo experimental de resistencia a la insulina asociado a obesidad (BATIRKO obeso)	53
1.2. Diseño del modelo experimental de envejecimiento asociado con la pérdida del tejido adiposo marrón	54
1.3. Obtención y genotipaje de los ratones transgénicos	54
1.3.1. Obtención de ratones UCP-1-Cre	54
1.3.2. Obtención de ratones IR LoxP/LoxP	55
1.3.3. Obtención de los ratones carentes del IR de forma tejido específica en el tejido adiposo marrón (BATIRKO)	55
1.3.4. Purificación del ADN de la cola del ratón	55
1.3.5. Genotipaje de los ratones por PCR	56
2. ESTUDIOS <i>IN VITRO</i>	57
2.1. Cultivo primario de cardiomiocitos neonatales	57
2.2. Cultivo primario de células de músculo liso vascular de aorta de ratón	58
2.3. Obtención de líneas celulares de cardiomiocitos y de células de músculo liso vascular <i>wild type</i> e IRLoxP	61
2.4. Obtención de líneas celulares de cardiomiocitos y de células de músculo liso vascular carentes del IR (CMIR KO y CMLVIR KO)	61
2.5. Obtención de líneas celulares que expresan las isoformas A y B del receptor de insulina (IR _A e IR _B)	62
2.6. Caracterización del cultivo primario y de las líneas celulares obtenidas	63
2.7. Congelación, descongelación y mantenimiento de las líneas celulares	65
3. TÉCNICAS EMPLEADAS EN LOS MODELOS <i>IN VIVO</i> E <i>IN VITRO</i>	66
3.1. Curvas de tolerancia a la glucosa	66
3.2. Curvas de tolerancia a la insulina	66
3.3. Test de secreción de insulina	67

3.4. Señalización <i>in vivo</i> de la insulina	67
3.5. Cálculo del HOMA-IR	67
3.6. Determinación del perfil metabólico	67
3.7. Determinación del perfil lipídico	68
3.8. Reactividad vascular	69
3.9. Inmunohistoquímica	70
3.10. Inmunofluorescencia	71
3.11. Análisis morfométrico	71
3.12. Determinación de la acumulación lipídica en tejidos	72
3.13. Determinación del anión superóxido en la arteria aorta	72
3.14. Análisis de expresión de genes por PCR cuantitativa a tiempo real	73
3.14.1. Extracción del ARN y obtención del ADNc	75
3.14.2. PCR cuantitativa a tiempo real	75
3.15. Análisis de proteínas mediante Western blot	76
3.15.1. Obtención de extractos de proteínas	76
3.15.2. Cuantificación de proteínas	76
3.15.3. Electroforesis de proteínas	77
3.15.4. Transferencia de proteínas	77
3.15.5. Inmunodetección de proteínas	77
3.16. Inmunoprecipitaciones	79
3.17. Obtención del ADN plasmídico para transfección	80
3.17.1. Transformación de bacterias competentes	80
3.17.2. Crecimiento bacteriano, extracción del ADN plasmídico y purificación del ADN	80
3.18. Infecciones retrovirales	82
3.18.1. Obtención de los retrovirus	82
3.18.2. Infección celular	84
3.18.3. Selección celular	84
3.19. Análisis estadístico	84

RESULTADOS

1. PAPEL DE LOS MECANISMOS COMPENSATORIOS FRENTE A LA RESISTENCIA A LA INSULINA EN EL DAÑO VASCULAR GENERADO EN EL RATÓN BATIRKO OBESO	85
1.1. Caracterización del modelo BATIRKO sometido a dieta grasa (HFD)	85
1.2. Diferencias en los mecanismos compensatorios en respuesta a la resistencia a la insulina en los ratones BATIRKO obesos	88
1.3. Diferencias en la función vascular de los grupos obesos de BATIRKO	100
1.4. Expresión diferencial de los factores de riesgo vascular en los ratones BATIRKO obesos	103
1.5. Expresión diferencial de TNF- α y UCP-2 en la arteria aorta de los BATIRKO obesos	108
2. PAPEL DEL TEJIDO ADIPOSO MARRÓN ASOCIADO AL ENVEJECIMIENTO EN EL DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD VASCULAR	115
2.1. Caracterización del modelo BATIRKO de 52 semanas de edad	115
2.2. Resistencia vascular a la acción de la insulina inducida por citoadipoquinas producidas por el BAT y WAT en el ratón BATIRKO de 52 semanas de edad	119
2.3. El ratón BATIRKO de 52 semanas de edad sufre disfunción vascular e inflamación local en la arteria aorta	123
2.4. Función de ROS y enzimas antioxidantes en la disfunción vascular observada en el ratón BATIRKO de 52 semanas de edad	128
3. METABOLISMO DE LA GLUCOSA Y ÁCIDOS GRASOS EN CULTIVOS CELULARES DE CARDIOMIOCITOS Y CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR	131
3.1. Estudios en cardiomiocitos	131
3.2. Estudios en células de músculo liso vascular	144

DISCUSIÓN

1. PAPEL DE LOS MECANISMOS COMPENSATORIOS FRENTE A LA RESISTENCIA A LA INSULINA EN EL DAÑO VASCULAR EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE OBESIDAD	153
---	-----

2. PAPEL DEL TEJIDO ADIPOSO MARRÓN ASOCIADO AL ENVEJECIMIENTO EN EL DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD VASCULAR	161
3. METABOLISMO DIFERENCIAL DE LOS ÁCIDOS GRASOS Y DE LA GLUCOSA EN DOS MODELOS CELULARES CARDIOVASCULARES	165
CONCLUSIONES	171
BIBLIOGRAFÍA	173

Introducción

1. RESISTENCIA A LA INSULINA

La resistencia a la insulina es un concepto clínico que implica la secreción de insulina a niveles suprafisiológicos debido a un fallo sistémico en la acción de la misma. Los tres órganos más importantes de acción de la insulina son el hígado, el músculo y el tejido adiposo. En consecuencia, son los tres órganos más relevantes en la resistencia a la insulina.

La resistencia a la insulina es la puerta de entrada de manera progresiva a la diabetes tipo 2 y además, junto con otros componentes, es una característica fisiopatológica esencial en el llamado síndrome metabólico.

1.1. MODELOS DE RESISTENCIA A LA INSULINA

A lo largo de los años se han generado distintos modelos de ratones modificados genéticamente con objeto de estudiar las complicaciones metabólicas de la resistencia a la insulina.

De una forma clásica, la regulación del metabolismo glucídico mediado por la insulina en los tejidos periféricos, es decir, hígado, tejido adiposo y músculo esquelético, se produce a través de la ruta de señalización IRS-PI3K-Akt. En el tejido adiposo y en el músculo esquelético, la activación de la vía produce la translocación del transportador de glucosa GLUT-4 provocando la captación de glúcidos por la célula. En el hígado, la insulina tiene otro papel distinto y principal como es regular la producción de glucosa mediante la inhibición de los genes gluconeogénicos. En la siguiente tabla se resumen los principales modelos monogénicos y poligénicos generados en ratón (Tabla 1).

Gen	Fenotipo	Referencia
IR	Muerte a los siete días por cetoacidosis diabética	Joshi y col., 1996
IRS-1	Retraso en el crecimiento	Tamemoto y col., 1994
IRS-2	Disfunción de la célula β	Previs y col., 2000
IRS-3	No se observó nada aparente	Liu y col., 1999
IRS-4	Crecimiento retardado, intolerancia a la insulina	Fantin y col., 2000
IRS-1+IRS-2	Letal embrionario	Miki y col., 2001 Withers y col., 1999
IRS-1+IRS-3	Diabetes lipopatrónica	Laustsen y col., 2002

Gen	Fenotipo	Referencia
IRS-1+IRS-4	Crecimiento retardado, intolerancia a la insulina	Laustsen y col., 2002
PI3K	Hipoglucemia	Terauchi y col., 1999
Glut-2	Fallo en la secreción de insulina, diabetes	Guillam y col., 1997
Glut-4	Corazón hipertrófico	Katz y col., 1995
PTP-1B	Aumento de sensibilidad a la acción de la insulina	Elchebly y col., 1999
Akt2	Resistencia a la insulina	Cho y col., 2001

Tabla 1. Modelos de resistencia a la insulina en ratón.

La resistencia a la insulina desempeña un papel clave en la patogénesis de diabetes, obesidad, hipertensión y enfermedades vasculares. La predisposición a la resistencia a la acción de la insulina es el resultado de factores genéticos y ambientales. La búsqueda de variantes genéticas que favorecieran la aparición de resistencia a la insulina ha sido infructuosa y frustrante debido a que es una enfermedad poligénica. Sin embargo, el uso de animales de experimentación permite, mediante técnicas de mutagénesis y transgénesis, desarrollar modelos murinos experimentales para verificar distintas hipótesis en la patogénesis de la resistencia a la insulina y comprobar la naturaleza poligénica de la misma.

El receptor de la insulina (IR) juega un papel muy importante en esta patología, así que obviamente, uno de los primeros modelos generados fue el del ratón carente del IR en todo el organismo. Estos animales fallecieron a los pocos días de nacer debido a una severa cetoacidosis [Joshi y col., 1996]. Cuando se eliminaron los sustratos del IR, IRS-1 e IRS-2, se observó que la ausencia del primero causaba un moderado retraso del crecimiento en esos ratones y una moderada intolerancia a la glucosa [Tamemoto y col., 1994]; sin embargo, el ratón carente de IRS-2 presentó una severa intolerancia a la glucosa y un defecto en la secreción de insulina debido a hipoplasia en las células β pancreáticas [Previs y col., 2000].

Cuando se obtuvo el modelo doble heterocigoto para IR/IRS-1^{+/-} [Bruning y col., 1997], se observó que presentaba resistencia a la insulina y que aproximadamente un 50% desarrollaba diabetes a los 6 meses. Este fenotipo se agrava en el triple heterocigoto IR/IRS-1/IRS-2^{+/-} [Kido y col., 2000].

1.2. MODELOS ANIMALES CARENTES DEL IR DE FORMA ESPECÍFICA DE TEJIDO (IRKO)

La inactivación de un gen utilizando la tecnología estándar de recombinación homóloga produce una pérdida de funcionalidad del gen en todas las células del organismo. Sin embargo, mediante la tecnología LoxP-Cre, se pueden generar modelos murinos carentes de un determinado gen en un tejido específico o en unas determinadas células, siempre y cuando se encuentre un promotor específico de ese tejido que permita expresar la recombinasa únicamente en el sitio de interés.

Utilizando la tecnología LoxP-Cre se han desarrollado modelos carentes del IR en varios tejidos (Tabla 2).

Genotipo	Fenotipo	Referencia
Constitutivo	Diabético, cetoacidosis. Letal	Accili y col., 1996 Joshi y col., 1996
Músculo esquelético (MIRKO)	Discreta intolerancia a la glucosa y adiposidad	Bruning y col., 1997
Músculo/tejido adiposo	Intolerancia a la glucosa	Lauro y col., 1998
Célula beta (β IRKO)	Hipoplasia de células β , severa inhibición de la secreción de insulina e intolerancia a la glucosa	Kulkarni y col., 1999
SNC (NIRKO)	Obesidad, infertilidad	Bruning y col., 2000
Tejido adiposo marrón (BATIRKO)	Defecto en la secreción de insulina. Diabetes	Guerra y col., 2001
Músculo cardíaco (CIRKO)	Reducción del tamaño y funcionalidad del corazón	Belke y col., 2002
Adipocito	Resistencia a la obesidad, longevidad	Blucher y col., 2002; Blucher y col., 2003

Genotipo	Fenotipo	Referencia
Endotelio vascular (VENIRKO)	Predisposición a alterar la reactividad vascular y a desarrollar retinopatías	Vicent y col., 2003
Hígado (LIRKOc)	Severa resistencia a la insulina con hiperglucemia transitoria	Michael y col., 2000
(LIRKOi)	Severa resistencia a la insulina e hiperinsulinemia, progresión a diabetes tipo 2	Escribano y col., 2009

Tabla 2. Modelos murinos carentes del receptor de insulina de forma específica de tejido (IRKO).

El tejido mayoritario que requiere insulina para la utilización de la glucosa como fuente de energía es el músculo esquelético, y por ello, el primer modelo generado de ratón carente del receptor de insulina tejido-específico fue MIRKO. Este ratón presentaba un descenso de la actividad quinasa del receptor de insulina de más del 90%, lo que conllevaba un cese severo de la acción de la insulina, pero no se llegaba a desarrollar diabetes. Sin embargo, el modelo MIRKO sí presentaba alteraciones metabólicas como aumento de los depósitos de grasa e hipertrigliceridemia, características del cuadro de síndrome metabólico [Bruning y col., 1997].

El modelo carente de IR en célula β , presentó un defecto en la secreción de la insulina similar al que aparece en los diabéticos tipo 2, causando una progresiva intolerancia a la glucosa y en algunos casos, incluso diabetes [Kulkarni y col., 1999].

El modelo NIRKO presentó hiperfagia, obesidad e hipogonadismo que condujo a una reducción de la fertilidad, poniendo de manifiesto la implicación del receptor de insulina en el control de la supresión del apetito y en la reproducción [Bruning y col., 2000].

El modelo CIRKO mostró un menor tamaño de cardiomiocitos y un metabolismo alterado, con un aumento de las tasas de asimilación de glucosa y de glucólisis y un descenso de la oxidación de ácidos grasos, manteniendo un fenotipo de corazón inmaduro [Belke y col., 2002].

Del hígado se generaron dos modelos, uno con delección del IR constitutiva (LIRKOc) y otro inducible (LIRKOi), es decir, se producía la delección del IR en respuesta a la inyección de un estímulo externo. En el modelo LIRKOc [Michael y col., 2000] se observó una importante resistencia a la insulina acompañada de una severa intolerancia a la glucosa y un fallo en la supresión de la producción hepática de dicho metabolito. Dicha intolerancia a la insulina revertía a partir de los cuatro meses. De hecho, a los seis meses los animales presentaban un fenotipo hipoglucémico. Sin embargo, en el LIRKOi [Escribano y col., 2009] se observó una alta hiperinsulinemia y un aumento de la masa de célula β pancreática proporcionales a la delección hepática del IR, y finalmente un fallo de la secreción de insulina que condujo a una diabetes descontrolada. Dicho fenotipo era irreversible.

Para estudiar la implicación de la insulina en la función endotelial, se generó el modelo VENIRKO [Vicent y col., 2003] que presentó una homeostasis de la glucosa y un desarrollo de la vasculatura normales, pero se observaron alteraciones en la regulación de la presión sanguínea y en la expresión de endotelina-1 y eNOS. Para estudiar más a fondo el papel que puede desempeñar la resistencia a la insulina endotelial en el agravamiento del proceso aterosclerótico, recientemente se ha generado el modelo doble *knockout* VENIRKO/Apo E^{-/-} [Rask-Madsen y col., 2010] y se ha puesto de manifiesto que la pérdida de la señalización de la insulina en el endotelio acelera la aterosclerosis basal de los ratones apo E^{-/-}.

1.3. MODELO BATIRKO

Uno de los modelos carentes del IR de forma tejido- específica, fue el de tejido adiposo marrón (BAT) que recibió el nombre de BATIRKO y se generó en nuestro laboratorio en el año 2001 [Guerra y col., 2001].

Este ratón se obtuvo usando la tecnología LoxP-Cre, de manera que el exón 4 del IR estaba flanqueado por las secuencias LoxP. La recombinasa Cre se encontraba bajo el promotor de la proteína desacoplante 1 (UCP-1), que es específica del tejido adiposo marrón. De manera que la inactivación del IR se producía exclusivamente en dicho tejido adiposo.

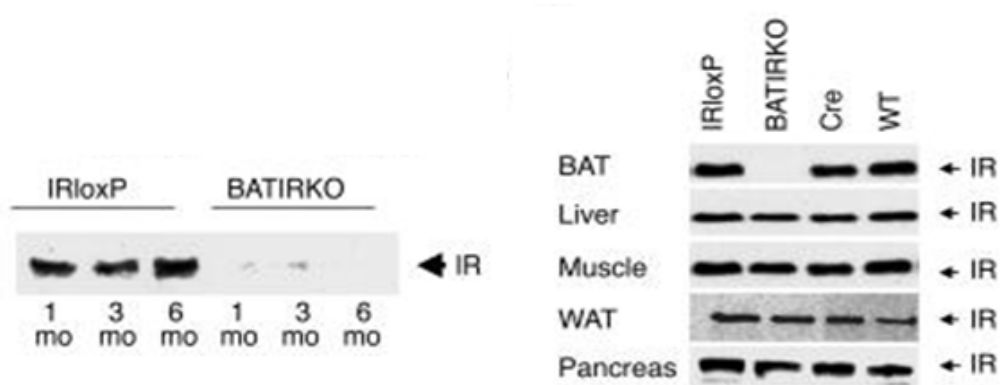


Figura 1. Deleción del receptor de la insulina en los ratones BATIRKO. A la izquierda, se observa que la deleción del receptor de la insulina fue estable a lo largo de la vida del animal. A la derecha, se puede observar que esta deleción fue específica del tejido adiposo marrón. [Guerra y col., 2001]

Estos ratones presentaron una lipoatrofia del tejido adiposo marrón dependiente de la edad. Así, a los 6 y 12 meses de edad, el BAT de los animales transgénicos se había reducido un 65% con respecto a los ratones control, debido a un enorme descenso de la expresión de genes lipogénicos.

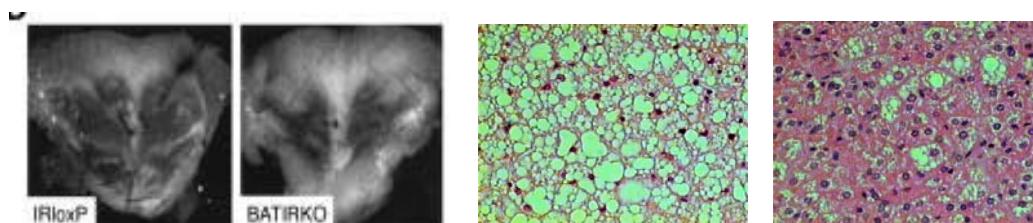


Figura 2. Lipoatrofia marrón del ratón BATIRKO. En las fotografías del tejido adiposo marrón de los ratones BATIRKO (izquierda) podemos observar una lipoatrofia marrón severa, caracterizada por una pérdida de la masa del tejido adiposo marrón debido fundamentalmente a una pérdida de lípidos, de manera que aumenta la eosinofilia (derecha), tal y como se describió en el trabajo publicado por Guerra y col., 2001.

Curiosamente, de forma paralela a la lipoatrofia marrón, estos animales presentaron una intolerancia a la glucosa dependiente de la edad, sin que tuviera lugar resistencia a la acción de la insulina. De manera que a los seis meses de edad, los animales BATIRKO presentaron una moderada hiperglucemia en el ayuno y esta intolerancia a la glucosa aumentó a medida que los animales envejecían.

Al estudiar más a fondo esta circunstancia, se encontró un defecto en la secreción de insulina intrínseco al animal, razón por la que no había una

hiperinsulinemia compensatoria a la hiperglucemia presente. Este defecto de la secreción de insulina se debía a un descenso de aproximadamente el 35% del tamaño de los islotes pancreáticos, debido a un efecto indirecto de la delección del receptor en el tejido adiposo marrón.

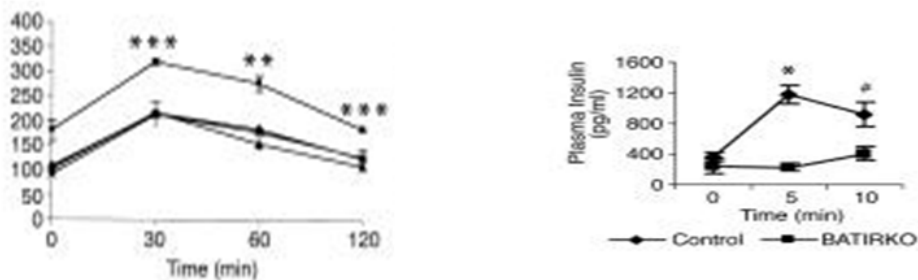


Figura. 3. Intolerancia a la glucosa y fallo en la secreción de insulina en los ratones BATIRKO. A la izquierda se puede observar la intolerancia a la glucosa de los ratones BATIRKO y a la derecha se muestra el test de secreción aguda a la insulina en el que se refleja el fallo en dicha secreción del ratón BATIRKO, como se describió en el trabajo publicado por Guerra y col., 2001.

En definitiva, este modelo murino puso de manifiesto dos aspectos desconocidos hasta la fecha de la homeostasis fisiológica del tejido adiposo marrón. El primero, es el importante papel de la insulina y su receptor en la adipogénesis del BAT a lo largo del desarrollo. Y el segundo es la importancia del tejido adiposo marrón en la regulación de la secreción de la insulina y la homeostasis glucídica, ya que la lipoatrofia marrón conduce a una reducción del porcentaje de masa de célula β y un defecto en la secreción de insulina en respuesta a la glucosa.

2. SÍNDROME METABÓLICO

El síndrome metabólico se conoce también como síndrome plurimetabólico, síndrome de resistencia a la insulina o síndrome X. Es una entidad clínica controvertida, con amplias variaciones fenotípicas, que aparece en personas con una predisposición endógena, determinada genéticamente y condicionada por factores ambientales. Se caracteriza por la presencia de insulino-resistencia e hiperinsulinemia como mecanismo de compensación, asociada a una intolerancia al metabolismo de glúcidos, hipertensión arterial, alteraciones lipídicas (hipertrigliceridemia, elevación de

cLDL, disminución de cHDL, aumento de ácidos grasos libres y lipemia postprandial) y obesidad, con un aumento de la morbimortalidad de origen arteriosclerótico.

Los factores ambientales que condicionan la aparición del síndrome metabólico son variados, entre ellos están la obesidad central o abdominal, el sedentarismo, la dieta hipercalórica rica en grasas o glúcidos y el tabaquismo.

El síndrome metabólico sería el paso inmediatamente anterior a la aparición de diabetes tipo 2 en pacientes que presenten resistencia a la insulina y obesidad, lo que además constituye un factor de riesgo para la enfermedad cardiovascular.

3. DIABETES TIPO 2

La diabetes es la primera y principal consecuencia del desorden anormal de la secreción de insulina y/o la deteriorada acción de la misma. Aproximadamente el 10% de los adultos con diabetes mellitus (DM) muestra una absoluta deficiencia de insulina (diabetes tipo 1 o insulino-dependiente), y el resto sufren una variación de grados de resistencia a la acción de la insulina dependiente de tejido (tipo 2 o no insulino-dependiente). Los principales tejidos diana de las acciones metabólicas de la insulina son el hígado, el músculo esquelético y el tejido adiposo. De éstos, el músculo esquelético es cuantitativamente el mayor consumidor de glucosa. El corazón, por su naturaleza muscular también sería un tejido dependiente de insulina. Sin embargo, es el tejido con menor disposición corporal de glucosa.

La diabetes tipo 2 es una enfermedad poligénica que afecta al 5-10% de la población de las sociedades occidentales y se caracteriza por defectos en la secreción y en la acción de la insulina [Warram y col., 1990; Virkamaki y col., 1999]. El primer defecto destacable de la diabetes tipo 2 es la resistencia periférica a la acción de la insulina en el músculo esquelético, tejido adiposo blanco e hígado [Martin, B. C. y col., 1992; Kahn 1994]. Se han descrito diversas alteraciones moleculares en el proceso de resistencia a la insulina, incluidos un descenso en el número o expresión del receptor de insulina, una disminución en la actividad del receptor tirosina (Tyr) quinasa, menor expresión del sustrato IRS-1, descenso de la fosforilación de IRS-1 y defectos en la translocación de los transportadores [Caro y col., 1987; Olefsky y Nolan 1995; Kerouz y col., 1997; Rondinone y col., 1997]. Esta resistencia a la insulina se compensa inicialmente por una hipersecreción de insulina. Sin embargo, en situaciones de enfermedad avanzada, este aumento de la secreción no es suficiente para que la

insulina actúe adecuadamente, por lo que se produce una hiperglucemia y un deterioro progresivo de las células β pancreáticas.

Varios estudios epidemiológicos en diferentes grupos de la población, indican que la DM tipo 2 progresa a lo largo de un continuo empeoramiento en la respuesta a la acción de la insulina, comenzando por una resistencia periférica a dicha hormona y terminando con la pérdida de secreción por parte de las células β del páncreas. En la mayoría de los pacientes, la resistencia a la acción de la insulina puede ser detectada mucho antes de que se produzca la intolerancia a la glucosa. Asimismo, la aparición en el tejido adiposo de resistencia a los efectos antilipolíticos de la insulina, provoca un incremento de la lipólisis y la liberación de ácidos grasos, disminuyendo la lipogénesis. Esta desregulación del metabolismo de los glúcidos y los lípidos, contribuye a acelerar la progresión de la resistencia a insulina. En los primeros estadios, las células β pancreáticas responden con un incremento en la secreción de la hormona generando este desorden metabólico. El exceso prolongado de insulina circulante hace que las células β no puedan mantener el mecanismo de compensación y fallen en el momento de responder apropiadamente a la glucosa, y esto desemboca en el desarrollo de intolerancia al azúcar. Así, aproximadamente un 5-10% de los pacientes intolerantes a la glucosa se convierte en diabético en menos de un año, continuando con un agravamiento progresivo de la resistencia a insulina. Las células adiposas generan más ácidos grasos, el hígado produce glucosa de manera incontrolada y las células β pancreáticas fallan totalmente, llegando a las últimas etapas de la enfermedad donde se requieren ya altas dosis de insulina exógena [De Fronzo, 1988]. La falta de respuesta a la acción de la insulina y la hiperinsulinemia, incluso en ausencia de diabetes, conducen a una gran variedad de anormalidades entre las que se incluyen un aumento de los triglicéridos, una disminución de los niveles de HDL, un aumento de secreción de VLDL, desórdenes en la coagulación, aumento de resistencia vascular, cambios en las concentraciones de hormonas tiroideas, atenuación del flujo de sangre periférico y ganancia de peso. Por todo ello, la resistencia a la insulina se asocia con obesidad, hipertensión, síndrome de ovario poliquístico, dislipidemia y aterosclerosis.

4. ATEROSCLEROSIS

La aterosclerosis es la primera causa de morbimortalidad cardiovascular en el mundo occidental. Se define como un proceso multifactorial y que presenta una lesión

típica conocida como placa de ateroma. Esta lesión se desarrolla en la pared de los vasos a lo largo de los años. Está formada por un depósito lipídico recubierto de tejido conectivo y distintos tipos celulares como células de músculo liso vascular (CMLV) y componentes de la sangre (monocitos/macrófagos, linfocitos T y plaquetas).

El desarrollo de la lesión se debe a una respuesta inflamatoria del endotelio que consta de tres fases: 1) disfunción endotelial y formación de la estría grasa; 2) progresión de la lesión; y 3) rotura de la placa y trombosis.

La aterosclerosis es una respuesta inflamatoria a una lesión del endotelio vascular [Ross 1993]. La etapa de estría grasa puede tener lugar en la infancia o en la juventud, siendo una lesión inflamatoria pura en la que participan linfocitos T y monocitos, que migran hasta la capa íntima [Stary 1994]. La progresión de la placa aterosclerótica está caracterizada por el aumento de los tipos celulares que se acumulan en la zona dañada de la pared vascular. La fase final de la lesión está precedida por la formación de un trombo que puede dar lugar a accidentes vasculares en corazón, cerebro o extremidades [Fuster y col., 1992].

4.1. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL Y FORMACIÓN DE LA ESTRÍA GRASA

Se han desarrollado varias teorías para explicar la aterosclerosis, pero la más aceptada es la descrita por Ross [Ross 1993], que considera dicha enfermedad una respuesta inflamatoria a una lesión del endotelio vascular provocada por estímulos de diversa índole. Esta lesión no tiene por qué ser física, bastaría con que fuera funcional para que se pusieran en marcha los mecanismos de respuesta a la agresión. Así, surgió el concepto de disfunción endotelial, de origen orgánico o funcional, que se acompaña de una serie de consecuencias como son: adhesión e infiltración celular de monocitos, alteración de la capacidad antitrombótica, de la capacidad fibrinolítica y de la respuesta vasomotora de la superficie vascular.

Si la lesión endotelial es más intensa, puede producirse la rotura de la capa endotelial como barrera de paso. Este hecho provoca que distintas moléculas tengan un acceso más fácil al interior de la pared, como por ejemplo las lipoproteínas, el fibrinógeno, etc. Existen numerosas evidencias experimentales, genéticas, epidemiológicas y clínicas, que resaltan el papel primordial que ejercen los lípidos en las fases más tempranas de la aterosclerosis. En condiciones normales, existe un intercambio de macromoléculas entre la luz y la pared vascular para la nutrición de la capa media. Entre otras sustancias, las células endoteliales captan lipoproteínas de baja

densidad (LDL) circulantes y las transportan hacia el espacio subendotelial donde se unen a proteoglicanos. La cantidad de LDL que atraviesa la pared arterial, es regulada por el endotelio y la lámina elástica interna [Penn y col., 1994]. Sin embargo, cuando tiene lugar una elevación de las concentraciones plasmáticas de LDL, se produce un aumento de la presencia de estas partículas en la pared vascular. Las LDL tienen tendencia a unirse a proteoglicanos, esto incrementa el tiempo de residencia de estas lipoproteínas en el espacio subendotelial y aumenta la probabilidad de oxidación en contacto con los radicales libres liberados por las células endoteliales, macrófagos y CMLV [Steinberg, D. 1997; Morel y col., 1984]. Estas LDL oxidadas (LDL_{ox}) pueden activar el endotelio [Rangaswamy y col., 1997], estimular la expresión de moléculas de adhesión [Parthasarathy y Rankin 1992] y la secreción de factores quimiotácticos, como la proteína quimiotáctica para monocitos (MCP-1) [Cushing y col., 1990], incrementando la adhesión y migración de las células circulantes y de las CMLV hacia la íntima [Chatterjee 1992].

Los monocitos se activan y se diferencian a macrófagos que expresan receptores de la LDL modificada (también llamados *scavenger* o basurero). Este receptor reconoce la LDL_{ox} y provoca la fagocitosis por parte del macrófago que hidroliza y reesterifica el colesterol, almacenándolo en gotas lipídicas y transformándose en célula espumosa [Quinn y col., 1987]. El acúmulo de estas células ricas en contenido lipídico, con un leve engrosamiento de la íntima cubierto de endotelio intacto, constituye macroscópicamente la estría grasa. Si el estímulo aterogénico desaparece y se controla la actividad inflamatoria, la estría grasa puede regresar, de manera que se regenera el endotelio y se restaura la función endotelial.

4.2. PROGRESIÓN DE LA LESIÓN

Si la primera respuesta inflamatoria no se neutraliza de forma eficaz, el proceso continúa. Una hiperlipidemia prolongada o la propia inflamación, conduce a una agresión mayor del endotelio, que incluso puede ir acompañada por su citolisis. En estas condiciones se favorece la liberación de factores mitogénicos, como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), que estimula la proliferación y migración de las CMLV desde la capa media hasta la íntima, dando lugar al engrosamiento de la neointima. Las células presentes en la neointima contribuyen en la formación de agentes quimiotácticos que atraerán a más células inflamatorias. A su

vez, las CMLV sintetizan matriz extracelular, lo que conducirá a la formación de la placa madura.

La ingesta continuada de LDLox por los macrófagos presentes en la lesión, provocará que se diferencien a células espumosas y que finalmente estallen, liberando todo su contenido intracelular al espacio extracelular. Esto dará lugar a la formación del núcleo lipídico, que será recubierto por matriz extracelular rica en colágeno y por CMLV (Figura 4).

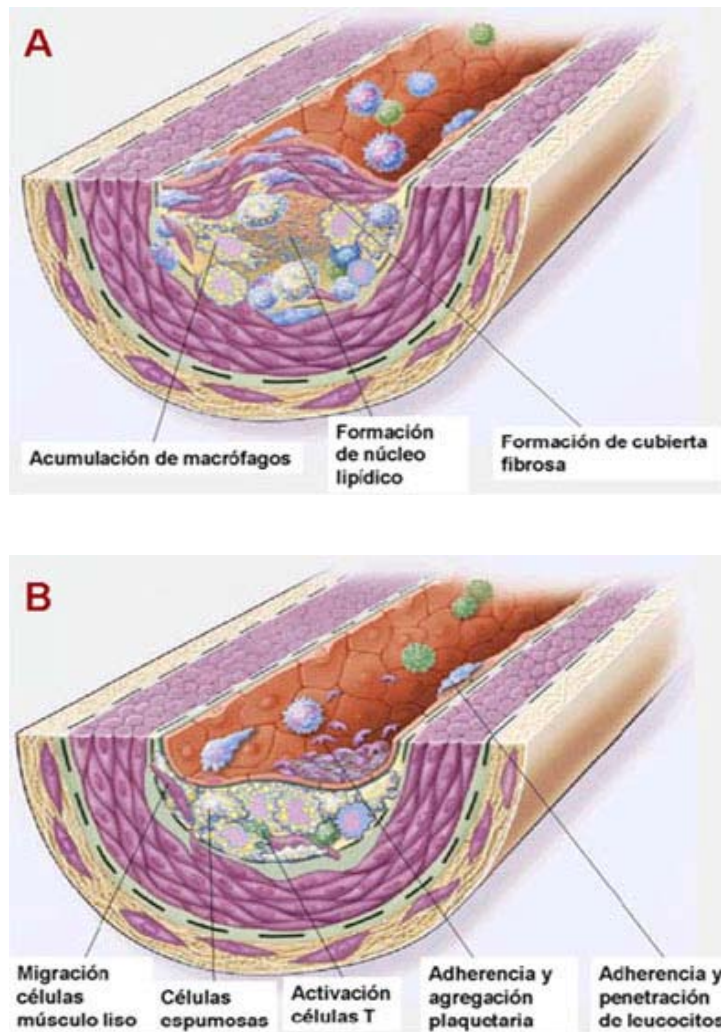


Figura 4. Esquema de la formación y progresión de la placa aterosclerótica. **A)** Se puede observar como se forma la placa aterosclerótica, caracterizada por un núcleo necrótico recubierto de una capa fibrosa que contiene macrófagos y lípidos. **B)** A medida que progresa la lesión, se van acumulando CMLV, células espumosas, plaquetas y otras células del sistema inmune.

4.3. ROTURA DE LA PLACA Y TROMBOSIS

La rotura de la placa de ateroma puede deberse a distintos procesos. Por un lado, se ha demostrado en diferentes trabajos la pérdida de células presentes en la lesión mediante un proceso denominado apoptosis o muerte celular programada [Isner y col., 1995; Bjorkerud y Bjorkerud 1996; Han y col., 1995]. Esta disminución en el contenido celular da lugar a una reducción de la resistencia de la pared de la lesión, pudiendo provocar una fisura. Por otro lado, las CMLV y los macrófagos sintetizan metaloproteasas, enzimas capaces de degradar la matriz extracelular, lo que provoca una menor consistencia de la lesión.

La presencia de un proceso inmunoinflamatorio en la placa aterosclerótica se considera el mecanismo decisivo que conduce a la desestabilización, rotura y subsiguiente formación de un trombo, que es la base de las consecuencias clínicas más graves de la aterosclerosis.

La mayoría de las trombosis de las lesiones ateroscleróticas van precedidas de una fisura en la placa que pone en contacto el núcleo lipídico, rico en factor tisular, con la sangre [Toschi y col., 1997] (Figura 5). Además se ha demostrado la presencia de macrófagos y CMLV activadas en la proximidad de las zonas de la fisura en placas de pacientes fallecidos por infarto agudo de miocardio [van der Wall y col., 1994]. Por ello, la reacción inflamatoria puede desempeñar un papel importante en la rotura de la placa. Del mismo modo, se ha encontrado una mayor incidencia de infiltración de macrófagos en muestras procedentes de endarterectomía carotídea de pacientes con síndromes isquémicos agudos que en las muestras procedentes de pacientes con angina estable [Moreno y col., 1994].



Figura 5. Corte transversal de una arteria totalmente ocluida por la rotura de la placa de ateroma. Se puede observar un trombo taponando la luz del vaso, impidiendo el paso del flujo de sangre y produciendo isquemia en el tejido afectado.

Una vez que se produce la fisura, rotura o ulceración de la placa, se exponen a la circulación los componentes del núcleo lipídico (mayoritariamente lípidos, microcalcificaciones y detritus celulares que incluyen macrófagos y CMLV activados) que, conjuntamente con la exposición del factor tisular, condicionan la formación local de trombina, la activación de plaquetas y la formación de fibrina [Golledge y Siew 2008]. Los monocitos-macrófagos presentes en la lesión sintetizan agentes procoagulantes (factor tisular o el factor XIIIa), factores relacionados con la fibrinólisis como el activador del plasminógeno semejante a la uroquinasa (u-PA), activador tisular del plasminógeno (t-PA) o inhibidores del activador del plasminógeno (PAI), así como radicales libres o proteasas. Estas últimas poseen capacidad de aumentar el daño endotelial y el espacio intersticial, favoreciendo la digestión de la matriz extracelular, lo que disminuye la resistencia de la pared arterial y aumenta la disfunción endotelial.

De la mayor o menor labilidad del trombo y de la capacidad de la fibrinólisis local, pueden resultar 3 evoluciones: 1) organización del trombo con crecimiento progresivo de la placa; 2) oclusiones intermitentes que producen isquemias transitorias, y 3) oclusión completa con necrosis de la zona afectada [Crouse 2006]. La mayoría de los episodios vasculares agudos, como el infarto agudo de miocardio y la angina o ángor inestable, se producen por trombosis en zonas de daño endotelial o en placas inestables [Burke y Virmani 2007].

Una vez formado el trombo, éste es invadido por monocitos que liberarán factor tisular que a su vez induce la formación trombina y dicha proteína es un potente activador de plaquetas. Éstas junto con la trombina, activan las CMLV de la vecindad de la arteria en la que reside el trombo. Las CMLV penetran en el trombo y empiezan a sintetizar colágeno invadiéndolo completamente, de forma que a los 8-10 días el trombo está completamente rodeado de endotelio disfuncional. La hipercolesterolemia está asociada con hipercoagulabilidad y con un aumento de la reactividad de las plaquetas en la zona de la lesión vascular [Badimon y col., 1991]. La génesis del tejido conectivo continúa hasta que a las 4-12 semanas el endotelio se normaliza y es capaz de sintetizar óxido nítrico, terminando el proceso cicatrizal. Las LDLox inhiben la actividad de la NO sintasa, promoviendo la formación de trombos, debido a que aumentan la unión al fibrinógeno [Chen, L. Y. y col., 1996].

4.4. MOLÉCULAS IMPLICADAS EN LA DISFUNCIÓN VASCULAR

4.4.1. Óxido Nítrico

El óxido nítrico (NO) es una pequeña molécula gaseosa que actúa como mediador en numerosos procesos biológicos. Se produce a partir del grupo guanidino de la L-arginina, siendo el otro producto de la reacción la L-citrulina. Esta reacción está catalizada por la óxido nítrico sintasa (NOS). Ésta es una hemoproteína que, además del sustrato [Leone y col., 1991], requiere oxígeno molecular, la presencia de calmodulina y cuatro cofactores: nicotinamín adenín dinucleótido fosfato reducido (NADPH), flavín adenín dinucleótido en su forma oxidada (FAD), flavín mononucleótido oxidado (FMN) y tetrahidrobiopterina (BH₄) [Stuehr 1997].

En el hombre se han identificado tres isoformas de este enzima: la NOS inducible (iNOS o NOS3), la NOS neuronal (nNOS o NOS1) y la NOS endotelial (eNOS o NOS2) [Forstermann y Kleinert 1995; Griffith y Stuehr 1995]. La NOS neuronal y la endotelial se expresan constitutivamente, pero la iNOS requiere la presencia de estímulos extracelulares específicos para su expresión. Las enzimas constitutivas generan pequeñas cantidades de NO, sin embargo la actividad de la iNOS es aproximadamente mil veces mayor. El NO sintetizado por la vía constitutiva participa en procesos fisiológicos o reguladores, mientras que el NO formado por la vía inducible participa en procesos inmunes, inflamatorios y de lesión celular.

Para que la NOS sea activa tiene que producirse el acoplamiento entre dos monómeros. Cada monómero a su vez presenta dos dominios, uno con actividad oxigenasa y otro con actividad reductasa, que actúan de manera independiente.

La actividad de las isoformas constitutivas está controlada por el complejo Ca²⁺/calmodulina intracelular, disminuyendo la actividad de éstas en presencia de quelantes de calcio [Moncada y col., 1990] y antagonistas de la calmodulina [Busse y Mulsch 1990]. Este control se ejerce de dos maneras:

- a) Mediante el aumento de la concentración de calcio: la mayoría de los agentes con efecto dependiente de endotelio (acetilcolina, angiotensina II, ATP, estradiol) aumentan la concentración de calcio, éste se une a la calmodulina y el incremento de este complejo induce una mayor actividad enzimática de la eNOS [Michel y col., 1997].
- b) Fosforilación de residuos tirosina: la activación de eNOS por agonistas dependientes de calcio, como el estradiol o el factor de crecimiento del

endotelio vascular (VEGF) requiere que se produzca la fosforilación de residuos tirosina del enzima [Papapetropoulos y col., 1997].

Además de la regulación por calcio y por fosforilación de residuos tirosina, la actividad de eNOS se puede modificar por la acción de múltiples proteína quinasa, mediante la fosforilación en el residuo serina 1177. Entre estas quinasa se encuentra la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), la proteína quinasa C (PKC), la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) y la serina/treonina quinasa Akt. Los factores que activan la eNOS a través de la fosforilación en la serina 1177 mediada por Akt son el estradiol, el VEGF y el factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I) [Hisamoto y col., 2001; Fulton y col., 1999; Michell y col., 1999 respectivamente]. Por otro lado, la fosforilación del residuo treonina en la posición 497 provoca un descenso de la actividad de eNOS [Michell y col., 2002]. Estudios recientes demuestran que las señales a través de la PKA conducen a fosforilación de la serina 1177 y defosforilación de la treonina 497, aumentando la actividad enzimática de eNOS. Sin embargo, la PKC promueve la defosforilación de la serina 1177 y la fosforilación de la treonina 497, causando un descenso de la actividad de eNOS.

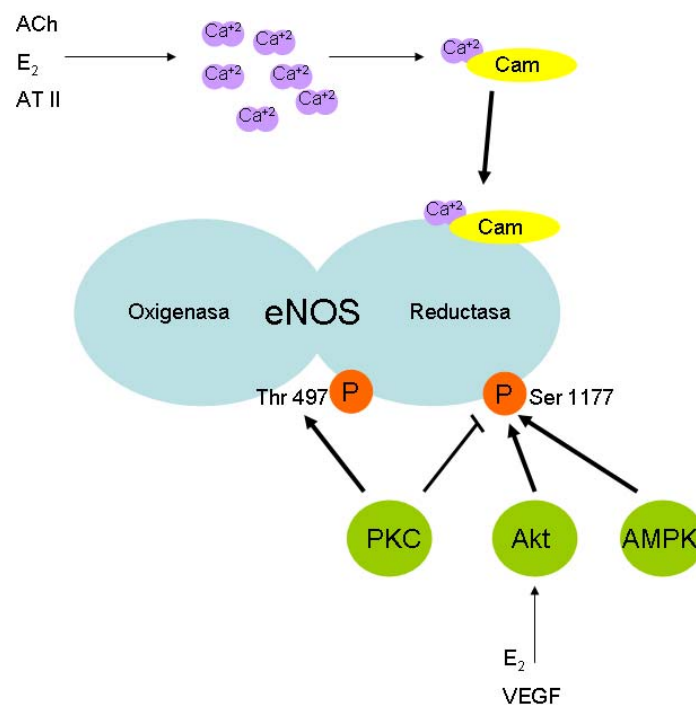


Figura 6. Regulación de la actividad de eNOS. La regulación de eNOS puede ejercerse a través de la unión del complejo calcio/calmodulina o bien a través de la fosforilación-defosforilación de residuos de aminoácidos en la subunidad reductasa de la eNOS. ACh: acetilcolina; E₂: estradiol; AT II: angiotensina II; Cam: calmodulina; Thr: treonina; Ser: serina.

Los estudios realizados hasta el momento sugieren que el NO sintetizado en una célula determinada no ejerce su respuesta biológica principal en las células de origen, sino en las células diana cercanas. Por lo tanto, de acuerdo con las propiedades fisicoquímicas, el NO sintetizado en las células endoteliales difunde rápidamente fuera de éstas hasta el interior de las CMLV adyacentes. Una vez en el citoplasma, promueve la activación de la guanilato ciclasa soluble (GCs), aumentando los niveles intracelulares de guanósil monofosfato cíclico (cGMP) sintetizado por ella, y por consiguiente, provocando vasodilatación [Moncada y Higgs 1991; Martin, W. y col., 1988].

El tono vascular se mantiene mediante la liberación endotelial de sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras [Davignon y Ganz 2004], siendo el NO el principal agente vasodilatador. Además de esta acción vasodilatadora, el NO también inhibe la proliferación celular y la inflamación, y tiene efectos antiagregantes sobre las plaquetas.

Una característica esencial de la disfunción vascular es la pérdida de vasodilatación dependiente de endotelio, lo que se relaciona con una disminución de NO. Este descenso, puede deberse a una reducción de la actividad y/o de la expresión de eNOS.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) reaccionan con el NO, disminuyendo la cantidad disponible, y formando peroxinitritos (ONOO^-) [Koppenol y col., 1992]. Estos radicales libres son oxidantes citotóxicos que causarán la nitración de proteínas, afectando a su función y por tanto a la función endotelial. Los ONOO^- son mediadores importantes de la oxidación de LDL, acentuando su papel aterogénico [Griendling y FitzGerald 2003]. Además, conducen a la degradación del cofactor de eNOS, lo que provoca un desacoplamiento de la enzima, de manera que la actividad oxigenasa y la formación de NO disminuyen, mientras que la actividad reductasa y la formación de ROS (especialmente de anión superóxido (O_2^-)) aumentan, lo que conduce a un incremento del estrés oxidativo y al deterioro de la función endotelial y vascular [Landmesser y col., 2003].

4.4.2. Endotelina-1

La endotelina-1 (ET-1) es un péptido producido por las células endoteliales, CMLV, macrófagos, leucocitos, cardiomiocitos y fibroblastos [Resink y col., 1990; Properzi y col., 1995] que tiene efectos sobre el tono vascular. Existen tres tipos de

endotelina, pero las células endoteliales sólo producen ET-1 [Inoue y col., 1989]. Sin embargo, los receptores de la endotelina están distribuidos por todo el organismo, ya que además de causar vasoconstricción, la ET tiene efectos pleiotrópicos en tejidos no vasculares. La ET-1 ejerce acciones vasoconstrictoras a través de la estimulación de los receptores ET_A de las CMLV y acciones vasodilatadoras a través de los receptores ET_B de las células endoteliales. Además de estos efectos, la ET-1 también promueve la proliferación de las células del endotelio, de las CMLV y de los fibroblastos. Esto se traduce en cambios estructurales debido a su efecto en la pared vascular [Golfman y col., 1993; Bobik y col., 1990; Simonson y col., 1989; Hirata y col., 1988].

La producción de ET-1 por las células endoteliales se estimula por factores como la adrenalina, angiotensina II, vasopresina, insulina, trombina, glucosa, citoquinas, factores de crecimiento y estímulos físicos.

La expresión de la ET-1 se ve disminuida por quelantes de calcio o inhibidores de la PKC, péptidos natriuréticos y NO [Emori y col., 1991; Emori y col., 1993; Boulanger y Luscher 1990]. Sin embargo, el factor fisiológico más importante para la regulación de la producción y liberación de la ET-1 es el flujo sanguíneo. Cuando se produce un aumento del flujo sanguíneo, se promueve la vasodilatación mediante la activación de receptores de células endoteliales con la liberación de NO y la disminución en la producción y liberación de ET-1 [Kuchan y Frangos 1993; Miller y Burnett 1992].

4.4.3. Angiotensina II

En el sistema renina-angiotensina clásico, la renina producida por el riñón transforma el angiotensinógeno producido en el hígado en angiotensina I, ésta se libera a la circulación y se convierte en la forma fisiológicamente activa angiotensina II (AngII), a través de la acción del enzima convertidor de angiotensina (ACE) que se distribuye principalmente por la circulación pulmonar.

La angiotensina II realiza su función principal a través de su receptor específico, el AT₁. La interacción de la AngII con su receptor produce vasoconstricción y liberación de aldosterona en las glándulas adrenales.

Esta visión clásica del sistema renina-angiotensina se ha visto modificada, ya que recientemente se ha descrito que existen componentes de este sistema en distintos tejidos como el corazón [Cohn y Tognoni 2001; Yamagishi, H. y col., 1993], la pared vascular [Dzau y Re 1994; Dzau 2001; Ruiz-Ortega y col., 2001], el riñón [Cheng y col.,

1995; Lafayette y col., 1992] y el cerebro [Morimoto y col., 2002; Phillips y Summers 1998; Yang y col., 1992], permitiendo la activación y síntesis local de ambos tipos de angiotensina.

El sistema renina-angiotensina tendría un papel clave en la patogénesis de la aterosclerosis mediante la estimulación de una serie de eventos celulares y moleculares que ocurren de forma coordinada y que se han observado en las lesiones [Pueyo y col., 2000; Pastore y col., 1999; Hernandez-Presa y col., 1997; Petnehazy y col., 2006 Kim, J. A. y col., 1996;]. En la literatura aparecen numerosas evidencias de que la AngII tiene importantes acciones proinflamatorias en la pared vascular, lo que conduciría a la progresión de la aterosclerosis [Brasier y col., 2002].

Los receptores clásicos que median las acciones endocrinas de la angiotensina II son el AT₁ y el AT₂ [Iwai y Inagami 1992]. Ambos han sido identificados en la pared del vaso, aunque el AT₁ es el que media la mayoría de las acciones aterogénicas de la angiotensina II [Nouet y Nahmias 2000; Sayeski y Bernstein 2001]. En

En las CMLV y en las células endoteliales se ha encontrado una gran densidad del receptor 1 de la angiotensina II. También se ha detectado el enzima ACE en ambos tipos celulares [Falkenhahn y col., 1995; Fernandez-Alfonso y col., 1997]. Así, muchos de los componentes del sistema renina-angiotensina se han encontrado en la vasculatura, permitiendo que este sistema se active localmente en lesiones ateroscleróticas y en los vasos dañados [Daugherty y col., 2004; Iwai y col., 1997]. Luego, la señalización a través de la AngII-AT₁ podría contribuir al inicio y progresión de la aterosclerosis.

La angiotensina II aumenta la expresión de moléculas de adhesión, quimioquinas y citoquinas [Pueyo y col., 2000; Tummala y col., 1999; Brasier y col., 2000]. Estas moléculas inducen disfunción endotelial, captación y oxidación de LDL y proliferación de CMLV [Harrison, D. G. 1997; Griendling y col., 1997; Daugherty y col., 2000; Keidar y col., 2001]. En lesiones ateroscleróticas avanzadas, la AngII estimula la expresión de metaloproteasas de la matriz (MMPs) [Luchtefeld y col., 2005] y de PAI-1 [Vaughan y col., 1995] provocando la desestabilización de la placa aterosclerótica y la alteración del balance fibrinolítico.

4.4.4. Moléculas de adhesión

Tanto la disfunción vascular como la posterior formación de la placa aterogénica, son procesos en los que se ve implicado el sistema inmune y que tienen

una alta carga de inflamación. Entre esas moléculas inflamatorias que intervienen en el reclutamiento de macrófagos, plaquetas y CMLV, se encuentran las moléculas de adhesión vasculares.

Las moléculas de adhesión celulares (CAMs) están implicadas en muchas enfermedades inflamatorias como esclerosis múltiple, asma y artritis reumatoide. En la patología de la aterosclerosis, se ha observado la existencia de un aumento de la expresión de las moléculas de adhesión en modelos animales y humanos [Johnson-Tidey y col., 1994; Wood y col., 1993; Zibara y col., 2000]. Las moléculas de adhesión son intermediarios cruciales en varios pasos del reclutamiento de leucocitos, de hecho, se ha mostrado que diferentes subconjuntos de moléculas de adhesión son los responsables del rodamiento y adhesión de células inflamatorias circulantes en el endotelio vascular [Carlos y Harlan 1994].

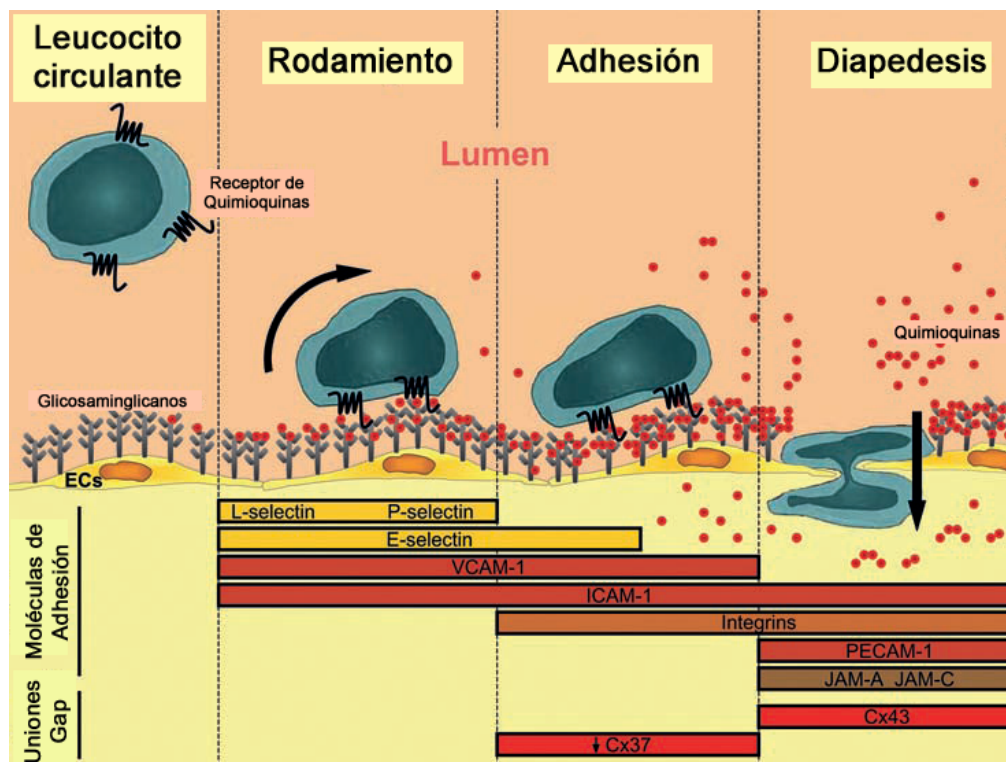


Figura 7. Implicación de diferentes moléculas de adhesión en los distintos pasos del reclutamiento de leucocitos en la disfunción endotelial (Adaptado de Braunersreuther y Mach 2006).

Las moléculas que median estas interacciones pertenecen principalmente a tres familias: selectinas, integrinas y miembros de la familia de las inmunoglobulinas.

Las **selectinas** inducen el rodamiento y adhesión de los leucocitos, mediante moléculas de unión de carbohidratos. Constan de tres subfamilias [Huo y Ley 2001]. La

P-selectina se almacena en los cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales y en los gránulos α de las plaquetas y se transloca rápidamente a la superficie celular en respuesta a estímulos proinflamatorios [Tedder y col., 1995a]. La E-selectina no se expresa en condiciones fisiológicas normales, pero se sintetiza y se exporta a la superficie de las células endoteliales en situaciones de inflamación [Kansas 1996]. Finalmente, la L-selectina se expresa en todos los granulocitos, monocitos y en la mayoría de los linfocitos [Ley 2003]. En un modelo murino carente del receptor de las LDL, se ha descrito que deficiencias en E- y P-selectina provocan un gran descenso de la extensión de las lesiones ateroscleróticas [Dong y col., 1998]. Por otro lado, en un modelo *in vitro*, se ha mostrado que la concentración de CAMs solubles y la expresión de dichas moléculas en la superficie celular, tienen una correlación positiva [Leeuwenberg y col., 1992]. Además, un estudio reciente sugiere que la P-selectina soluble podría ser usada como marcador de progresión de la enfermedad en pacientes con enfermedad arterial coronaria [Marschang y col., 2006]. Por el contrario, el papel de la L-selectina en aterogénesis no está completamente claro, aunque en ratones deficientes en L-selectina se ha observado un peor reclutamiento de leucocitos en las zonas de inflamación [Tedder y col., 1995b]. Según Eriksson y col. [Eriksson y col., 2001], la L-selectina parece desempeñar un papel en la acumulación de células T circulantes durante la enfermedad.

Las integrinas y los miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas también se ven envueltos en el reclutamiento de leucocitos, ya que median la adhesión y trasmigración de los leucocitos al interior de la pared vascular.

Las **integrinas** son una familia de receptores de la superficie celular. Este receptor está compuesto por subunidades α y β que forman heterodímeros $\alpha\beta$ [Hynes 2002]. Las integrinas median el contacto célula-célula, célula-matriz extracelular y célula-patógeno. También regulan la “búsqueda” de leucocitos, organizan la sinapsis inmunológica y participan en la coestimulación, migración y fagocitosis.

Los **miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas** se caracterizan por un pequeño dominio citoplásmico, una región transmembrana y varios dominios extracelulares repetidos y parecidos a las IgG [Carlos y Harlan 1994]. Entre estas proteínas se encuentran las moléculas de adhesión intercelular 1, 2 y 3 (ICAM), la molécula de adhesión de células vasculares (VCAM-1) y la molécula de adhesión de células endoteliales y plaquetas (PECAM-1). La función principal de estas moléculas es actuar como receptores de las integrinas.

La inhibición de la interacción entre las moléculas de adhesión y sus ligandos, desciende la adhesión de leucocitos, la diapédesis y en algunos casos, también afecta el rodamiento de leucocitos.

El aumento de la expresión de las moléculas de adhesión en el endotelio activado es una característica crítica de la aterosclerosis. La primera evidencia se produjo al observar que se inducía la expresión de VCAM-1 en las células endoteliales, en respuesta a la acumulación de colesterol en la íntima de las aortas [Cybulsky y Gimbrone 1991]. También se observó la expresión de ICAM-1 y VCAM-1, en arterias coronarias humanas [Davies y col., 1993]. Y además, el tratamiento de CMLV con TNF- α produjo un aumento de VCAM-1, tanto en la expresión en la superficie celular como en el ARNm, lo que sugiere que la expresión aórtica de VCAM-1 sería dependiente de citoquinas [Couffinhal y col., 1994].

La aterosclerosis es una enfermedad que afecta a determinadas regiones de la vasculatura, como las zonas de curvatura y bifurcación de los vasos [Garin y Berk 2006]. Estas regiones se caracterizan por oscilaciones del flujo que inducen la expresión de moléculas de adhesión proinflamatorias como ICAM-1 y VCAM-1 [Brooks y col., 2002]. En un modelo de conejo sometido a dieta aterogénica, se observó que dicha dieta también indujo rápidamente la expresión de VCAM-1 en el endotelio aórtico [Li, H. y col., 1993]. También se demostró que las LDL oxidadas provocan un aumento de las VCAM-1 [Khan y col., 1995]. De manera que existen numerosas evidencias de que la expresión de VCAM-1 está regulada por factores proaterogénicos.

Un hecho digno de mención, es que el aumento de VCAM-1 se ha detectado principalmente en aquellas zonas del endotelio susceptibles de desarrollar aterosclerosis [Nakashima y col., 1998]. También se ha observado una expresión elevada de VCAM-1 e ICAM-1 en placas ateroscleróticas coronarias humanas, junto a un aumento del número de macrófagos y células T en las regiones de neovascularización de la placa [O'Brien y col., 1996]. Estos resultados sugieren la existencia de un reclutamiento de células inmunes, dependiente de VCAM-1 e ICAM-1 a través de la neovasculatura, que podría participar en la aterosclerosis.

La molécula ICAM-1 está regulada por estímulos proinflamatorios y también se vería envuelta en la aterosclerosis, presumiblemente a través de la regulación del reclutamiento de monocitos en las áreas susceptibles de aterosclerosis.

La PECAM-1 se expresa en los bordes laterales de las células endoteliales y en la superficie de las células hematopoyéticas e inmunes, incluyendo macrófagos,

neutrófilos, monocitos, células *natural killer*, mastocitos, linfocitos y plaquetas [Muller 2003]. Al igual que las otras moléculas de adhesión, PECAM-1 tiene importantes propiedades de señalización. Se ha detectado la expresión de PECAM-1 en las células endoteliales de aortas susceptibles de aterosclerosis, así como en zonas de neovascularización de placas ateroscleróticas [Li, C. y col., 2006].

4.5. MOLÉCULAS IMPLICADAS EN EL PROCESO DE INFLAMACIÓN

El proceso inflamatorio en la aterosclerosis está regulado por una serie de moléculas de distinta naturaleza y función. Entre estos mediadores inflamatorios podemos destacar las citoquinas, las quimioquinas, los prostanoïdes y las especies reactivas de oxígeno.

4.5.1. Las Citoquinas

Las citoquinas son péptidos de pequeño tamaño que median la activación, proliferación y migración celular a través de sus receptores de membrana. Tienen funciones a nivel fisiológico en la homeostasis, participando en la reparación del tejido dañado, pero su producción excesiva conduce a situaciones patológicas, de ahí su implicación en enfermedades inflamatorias, inmunes e infecciosas [Arend y Dayer 1990].

Hay dos tipos de citoquinas dependiendo de la función que ejercen: las citoquinas proinflamatorias y las inmunorreguladoras.

Dentro del primer grupo, se encuentran el factor necrótico tumoral (TNF) α , la interleuquina (IL) 1β y la IL-6. Son sintetizadas por macrófagos, fibroblastos, células endoteliales y son responsables de la activación de un gran número de células, en las que estimulan la producción de moléculas de adhesión, quimioquinas y otros mediadores inflamatorios [Duff 1994; Libby y col., 1995]. Desempeñan un papel muy importante en el desarrollo de la lesión aterosclerótica, siendo liberadas tanto por las células espumosas como por el endotelio dañado. Además, no sólo contribuyen a eventos tempranos como la migración de células morfonucleares (MNs) regulando la expresión de la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1) y de moléculas de adhesión [Libby y col., 1995], sino también a la progresión de la placa madura. En este sentido, se ha descrito que citoquinas como TNF- α e IL- 1β estimulan a los macrófagos y células residentes produciendo PDGF, factor mitogénico que induce la proliferación

de CMLV, favoreciendo así el crecimiento de las placas [Raines y Ross 1996]. Por tanto, su acción inductora permite amplificar y perpetuar la respuesta inflamatoria.

La IL-1 es una citoquina de 17 kDa producida por una gran variedad de células. Su gen codifica 2 isoformas con un 25% de homología, la IL-1 α y la IL-1 β . La última representa el 90% de la IL-1 liberada al medio extracelular, mientras que la IL-1 α es una molécula inicialmente unida a membrana. Ambas proteínas surgen tras el procesamiento de precursores de aproximadamente 30kDa, que en el caso de IL-1 α tiene actividad biológica. La IL-1 α y la IL-1 β son capaces de unirse, aunque con distinta afinidad, al mismo receptor de membrana provocando efectos similares en las células dianas.

El TNF fue identificado en 1984 como una citoquina con efectos antitumorales tanto *in vitro* como *in vivo*. La familia de TNF consta por lo menos de 18 miembros distintos que exhiben el 15-25% de homología en su secuencia de aminoácidos. Los miembros de esta familia se unen a distintos receptores, que presentan homología en su dominio extracelular. Estas citoquinas median proliferación, supervivencia o apoptosis celular. Aunque hay diferentes receptores, todos ellos comparten vías de señalización que median la activación del factor nuclear- κ B (NF- κ B) y de proteínas quinasas activadas por mitógenos (c-jun N-terminal quinasa). La regulación del crecimiento celular, la activación de NF- κ B y de la quinasa terminal c-jun, por la familia del TNF está mediada a través de la asociación/ activación secuencial de una serie de proteínas de señalización celular: los receptores de TNF asociados a factores o a proteínas, quinasas inductoras de la activación de NF- κ B y quinasas de I κ B α . La señales apoptóticas y antiapoptóticas son activadas simultáneamente por la misma citoquina en la propia célula [Gaur y Aggarwal 2003].

En el segundo grupo de citoquinas, las inmunorreguladoras, se encuentran la IL-2, la IL-4, la IL-5 y el interferón (IFN) γ . Se producen mayoritariamente en los linfocitos T y están relacionadas con la activación y amplificación de la respuesta inmune humoral. En las zonas afectadas se detecta una mayor concentración de las citoquinas proinflamatorias que de las inmunorreguladoras, por lo que éstas actúan a distancias cortas, debido a que su producción está muy controlada [Duff 1994]. El IFN- γ , inhibe la síntesis de colágeno a la vez que induce la liberación de metaloproteasas, enzimas que degradan el colágeno de la cápsula fibrosa, favoreciendo el debilitamiento de la placa, siendo así más vulnerable a la rotura.

4.5.2. Las Quimioquinas

Las quimioquinas desempeñan un papel clave en el desarrollo del proceso inflamatorio. Así, MCP-1 se ha detectado tanto en las placas de ateroma humano como en las áreas ricas en macrófagos de las lesiones ateroscleróticas de conejos [Yla-Herttuala y col., 1991]. En las últimas décadas, se ha identificado una numerosa familia de moléculas quimioatrayentes (quimioquinas) implicadas en la quimiotaxis leucocitaria.

Son un grupo de citoquinas de bajo peso molecular caracterizadas por presentar en su estructura primaria cuatro cisteínas (Cys) en posiciones muy conservadas, que se unen mediante puentes de disulfuro intracatenarios [Oppenheim y col., 1991]. Aunque tienen entre un 20-40% de homología en la secuencia de aminoácidos y una estructura terciaria muy similar, no están muy conservadas entre las diferentes especies. Son producidas por una gran variedad de células inflamatorias, endoteliales y parenquimales. Los receptores de las quimioquinas presentan siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G, por lo que su activación conduce a una disminución de la concentración de AMPc. La interacción de las quimioquinas con sus receptores es muy poco selectiva, de modo que distintas quimioquinas pueden unirse a un mismo receptor y varios receptores pueden interaccionar con una misma citoquina.

Se clasifican dependiendo de la disposición de las dos Cys más cercanas a su extremo NH₂- terminal, diferenciando dos subfamilias: la subfamilia α (CXC), cuyos miembros presentan un aminoácido separando las dos Cys, y la subfamilia β (CC) en el que las dos Cys están contiguas [Rollins 1997].

Dentro de la subfamilia α (CXC), se diferencian dos grupos en función de la presencia o ausencia de una secuencia de tres aminoácidos precediendo al primer residuo de Cys, la secuencia ELR. La mayoría de quimioquinas del grupo ELR son potentes quimioatrayentes de neutrófilos pero no de MNs. Esta propiedad parece estar ligada a la presencia del motivo ELR, siempre que se encuentre lo más próxima al extremo NH₂ terminal. La IL-8 es el prototipo de este grupo. Es producida por una gran variedad de células como linfocitos T, neutrófilos, fibroblastos, células endoteliales, epiteliales y MNs. Por el contrario, las quimioquinas que no presentan el motivo ELR presentan actividades muy heterogéneas. Entre ellas, están la proteína inducible por el interferón 10 (IP-10) o el factor 4 de plaquetas (PF-4), que presentan una baja actividad quimiotáctica para neutrófilos; sin embargo en muchos casos son eficaces quimioatrayentes de linfocitos T e incluso son angiogénicas [Rollins 1997].

La otra subfamilia de quimioquinas, la subfamilia β (CC), posee una funcionalidad muy heterogénea, aunque ninguna de ellas es capaz de atraer neutrófilos. En su mayoría, son potentes quimioatrayentes de MNs. El ejemplo más representativo es MCP-1, que además de inducir la expresión de integrinas en esas células [Jiang y col., 1992], atrae a linfocitos T y activa la liberación de histamina por los basófilos [Bischoff y col., 1992].

4.5.3. Los Prostanoides. El Tromboxano A₂.

Los prostanoides son productos de la ciclooxigenasa (COX) derivados de ácidos grasos insaturados. Se clasifican en prostaglandinas (PGs) y tromboxanos (Tx). Ejercen una gran variedad de acciones en diferentes tejidos y células. Las acciones más típicas son la vasorrelajación y vasoconstricción de varios tipos de músculo liso. Además, modulan la actividad neuronal por inhibición o estimulación en la liberación de neurotransmisores. Por otro lado, las prostaglandinas participan en la regulación de la secreción y movilidad del tracto gastrointestinal, así como en el transporte de iones y agua en el riñón. Están implicados en apoptosis, diferenciación celular y oncogénesis. Asimismo, participan en la regulación de la actividad plaquetaria y en la homeostasis [Narumiya y col., 1999].

Los precursores de estos compuestos son los ácidos grasos poli-insaturados que se transforman por esterificación en glicerol, colesterol y fosfolípidos almacenados en la membrana plasmática. El mecanismo biosintético de los prostanoides engloba tres pasos: 1) la liberación de ácidos grasos de la membrana, siendo el ácido araquidónico (AA) el más abundante de todos ellos; 2) su conversión en un endoperóxido inestable (PGH₂); y 3) la isomerización o reducción de este producto intermedio hasta formar las PGs (PGD₂, PGE₂, PGF₂), prostaciclina (PGI₂) y tromboxanos (TxA₂) [Smith, W. L. y col., 1991].

En la primera fase participan dos sistemas de lipasas activadas por la interacción de un estímulo con su receptor en la célula diana. Son la fosfolipasa C, que hidroliza los derivados del fosfatidilinositol, y la fosfolipasa A₂ que hidroliza los otros fosfolípidos de membrana, siendo la lipasa que más participa en este proceso. Entre los estímulos que pueden iniciar esta primera fase destacan la bradiquidina, la trombina, citoquinas y factores de crecimiento [DeWitt 1991]. El AA es el sustrato de la COX, y este enzima cataliza la oxidación del ácido graso para formar PGG₂ y su posterior reducción a PGH₂. A partir de este metabolito intermedio, y debido a la acción de las

correspondientes enzimas sintetas (TxAS, PGIS, PGDS, PGES y PGFS), se obtienen los diferentes prostanoides (TxA₂, PGI₂, PGD₂, PGE₂ y PGF₂) respectivamente. Los diferentes prostanoides ejercen su acción a través de sus correspondientes receptores de membrana (IP, DP, EP, FP y TP) (Figura 8).

El TxA₂ es producido principalmente por las plaquetas activadas y macrófagos [Pawlowski y col., 1983]. Ejerce dos funciones: la estimulación de la función plaquetaria y la contracción del músculo liso, induciendo agregación plaquetaria, vasoconstricción y broncoconstricción [Hamberg y col., 1975]. Recientemente se le ha atribuido un papel proinflamatorio y proaterogénico, debido a que la activación de su receptor (TP) induce la expresión de moléculas de adhesión (VCAM-1, ICAM-1 y ELAM-1) en células endoteliales [Ishizuka y col., 1998], la migración de dichas células y angiogénesis [Daniel y col., 1999] Además, el bloqueo de su receptor suprime la liberación de MCP-1 [Ishizuka y col., 2000].

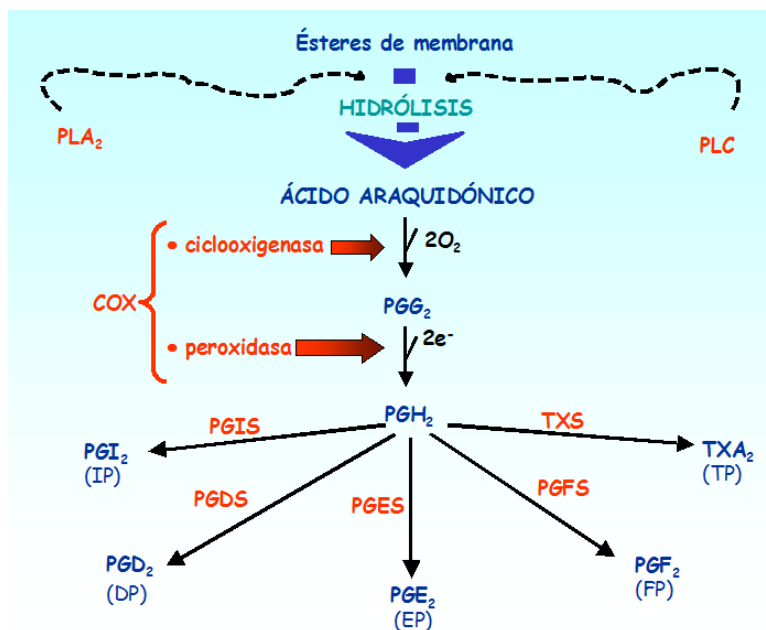


Figura 8. Ruta de síntesis de los prostanoides.

4.5.4. Las especies reactivas de oxígeno (ROS)

La mayor parte de los factores de riesgo de la aterosclerosis, como la hipercolesterolemia, la diabetes, la hipertensión, el tabaco, la edad y la intolerancia a nitratos, incrementan la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por células endoteliales, CMLV y células adventicias. Se ha demostrado que las ROS inician diferentes procesos implicados en la aterogénesis, incluidos la expresión de moléculas de adhesión, la estimulación de la proliferación y migración de CMLV, la apoptosis en el endotelio, la oxidación de lípidos, la activación de metaloproteasas y la alteración de la actividad vasomotora.

Las ROS participan en la aterosclerosis a través de varios sistemas enzimáticos: xantina oxidasa (XO), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH) y la óxido nítrico sintasa (NOS) [Harrison, D. y col., 2003]. Estas enzimas utilizan diferentes sustratos como fuentes de electrones y reducen al oxígeno para formar una gran variedad de ROS. La reducción de un electrón del oxígeno conduce al anión O_2^- y de dos electrones, al peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La dismutación del O_2^- al H_2O_2 está catalizada por la superóxido dismutasa (SOD). A partir del O_2^- y el H_2O_2 derivarán el resto de ROS, incluidos radicales lipídicos, carbonados, tiólicos e hidroxílicos y ácido hipocloroso (Figura 9). Diversos estudios clínicos han demostrado la implicación de estos sistemas enzimáticos en la aterosclerosis. Uno de ellos, describe que la actividad enzimática de la XO está incrementada en pacientes con enfermedad coronaria arterial (CAD), contribuye a la disfunción endotelial y así promueve el proceso aterosclerótico [Spiekermann y col., 2003]. Otro estudio demuestra que pacientes con CAD tienen una reducción de la actividad de SOD extracelular que podría contribuir a la disfunción endotelial [Landmesser y col., 2000]. Por tanto un aumento de la actividad de la XO con una reducción de los niveles de la SOD extracelular, puede conducir a situaciones patológicas por un incremento de las ROS. Por otro lado, la XO generaría más O_2^- y los niveles extracelulares de la SOD serían insuficientes para neutralizar el O_2^- generado.

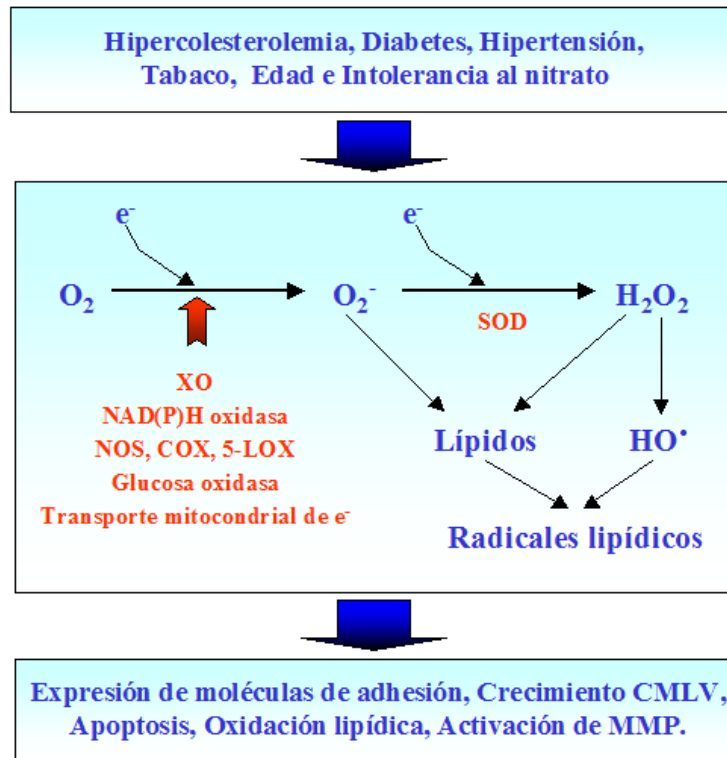


Figura 9. Esquema de las reacciones que conducen a la formación de las ROS y su papel en la aterosclerosis.

4.5.5. El Factor Inhibidor del Activador del Plasminógeno (PAI-1)

La degradación proteolítica de los coágulos de fibrina está mediada por un enzima llamado plasmina. Se forma en la circulación a partir de un precursor inactivo denominado plasminógeno, por mediación de la acción proteolítica de los factores activadores del plasminógeno (PA). Los inhibidores de estos PA son los llamados inhibidores del activador del plasminógeno (PAI).

La existencia de estos PAI ha sido controvertida durante mucho tiempo, hasta que en 1983 se tuvo evidencia de la existencia real de dichos inhibidores [Travis y Salvesen 1983].

Los PAI se pueden clasificar en tres grupos [Sprengers y Kluft 1987]: el tipo endotelial o PAI-1, el placentario o PAI-2 y la proteasa-nexina-I.

El PAI-1 es una glicoproteína de pequeño peso molecular y pertenece a la familia de los inhibidores de proteasas serínicas. Es el principal inhibidor fisiológico de los activadores tipo t-PA (tisulares) y u-PA (urinarios) y juega un importante papel en la regulación de la fibrinólisis. Este inhibidor se sintetiza por células endoteliales,

células de músculo liso, adipocitos y hepatocitos. Está presente en los gránulos α de las plaquetas (90%) y en el plasma (10%) donde circula en forma activa ligado a una proteína estabilizadora (vitronectina), siendo su vida media de 10 minutos. Los niveles plasmáticos de PAI-1 en sujetos sanos están entre 0,5-40 U/ml, mientras que los de PAI-1 antigénico (plaquetario) están alrededor de 20 ng/ml [Loskutoff y col., 1989].

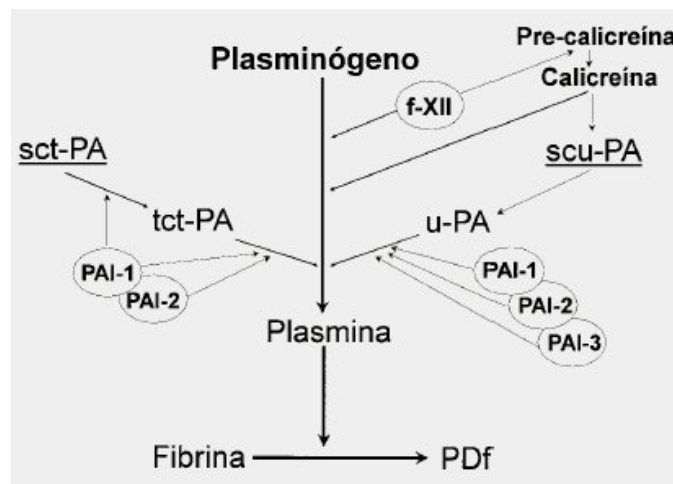


Figura 10. Principales inhibidores de la activación del plasminógeno.

El compartimento sanguíneo más importante de PAI-1 lo constituyen las plaquetas, donde se almacena en los gránulos α y se libera por acción del colágeno y ADP. El hígado, el adipocito, el endotelio o el músculo liso vascular también contribuyen a la presencia en la sangre de este inhibidor. Su síntesis en el endotelio, es regulada por numerosas sustancias como endotoxina, IL-1, TNF, trombina y diversos factores de crecimiento. Este inhibidor, en condiciones patológicas, aumenta su expresión y contribuye directamente a la proliferación y migración de las células de músculo liso vascular [Chen, Y. y col., 2006]. En cuanto a la secreción de PAI-1 por el tejido adiposo, se ha observado una mayor producción del mismo en la grasa visceral que en la grasa subcutánea, lo cual podría relacionarse con el incremento en los niveles de PAI-1 observados en la obesidad central y con el desarrollo de las alteraciones vasculares asociadas a la misma [Shimomura I y col., 1996]. En el hepatocito, sin embargo, el principal regulador de la síntesis de PAI-1 sería la insulina.

En su estado normal, el endotelio tiene una acción profibrinolítica y anticoagulante. Cuando ocurre el proceso de inflamación en la aterosclerosis, el endotelio se convierte en antifibrinolítico y procoagulante. La activación del sistema de

coagulación provoca la liberación de citoquinas que producen una intensa liberación de PAI-1 [Loskutoff y col. 1989]. Puede encontrarse bajo tres formas moleculares: latente, activa y formando complejos con los activadores. El PAI-1 plaquetario está en forma latente, pudiendo ser reactivado *in vivo*. Sin embargo, el PAI-1 plasmático, se encuentra fundamentalmente en su forma activa [Loskutoff y col., 1989]. La interacción del PAI-1 con los activadores tiene lugar a través de la formación de un complejo en el centro reactivo arginina 346-metionina 347, con liberación de un péptido intermedio [Colucci y col., 1986].

En cuanto a su papel fisiopatológico, se ha observado que la concentración de PAI-1 aumenta en situaciones clínicas relacionadas con fenómenos trombóticos, infarto de miocardio, septicemia y síndrome metabólico.

Debido a que el deterioro de la capacidad fibrinolítica está asociado con un incremento del riesgo cardiovascular, la disminución de PAI-1 podría proporcionar cardioprotección. De hecho, estudios sobre el análisis de las concentraciones de PAI-1 en mujeres pre- y post-menopáusicas en el "*Framingham Offspring Study*", han demostrado que las mujeres post-menopáusicas presentan niveles de PAI-1 más elevados que se pueden reducir a niveles pre-menopáusicos mediante terapia de estrógenos. Esta reducción en el efecto de PAI-1 se cree que contribuye al efecto total de la terapia de sustitución de estrógenos en la reducción del riesgo de enfermedad cardíaca [Gebara y col., 1995].

Por otro lado, en un estudio realizado en personas con síndrome metabólico, se observó una correlación positiva de altas concentraciones de PAI-1 con dicha situación clínica, y este aumento de PAI-1 se asoció con alteraciones de la glucemia, la presión arterial sistólica y los triglicéridos [Ingelsson y col., 2007].

5. RESISTENCIA A LA INSULINA Y DAÑO VASCULAR

En la clínica siempre se conoció que la resistencia a la insulina o la hiperinsulinemia sostenida son factores de riesgo para la aparición de enfermedad vascular. Sin embargo, no se sabía si las arterias sufrían estos daños porque no podían responder a la hormona, o si era debido a una exposición excesiva a la misma.

En un estudio reciente desarrollado en ratones, se ha observado que el efecto de la insulina en las arterias tendría un papel protector frente a la formación de placas ateroscleróticas, ya que los ratones que presentaban resistencia a la insulina en el

endotelio, desarrollaban unas placas ateroscleróticas mayores [Rask-Madsen y col., 2010].

Se sabe que existen varios mecanismos compartidos por la resistencia a la insulina y la disfunción endotelial. De hecho, su asociación marcaría el comienzo del proceso aterosclerótico [Ross 1999]. Varios estudios han sugerido que la disfunción endotelial en situaciones de resistencia a la insulina, es un paso previo a la aparición de una hiperglucemia patente. Así, se ha observado que pacientes con un primer grado de diabetes tipo 2 sufren un empeoramiento de la vasodilatación dependiente de endotelio [Goldfine y col., 2006]. En este sentido, en los estados hiperglucémicos que aparecen en los distintos grados de diabetes, se produce un descenso en la expresión de eNOS y un aumento de la expresión de ET-1, como parte de un mecanismo glucotóxico debido a la exposición a altas concentraciones de glucosa de forma crónica [Salt y col., 2003]. De hecho, la disfunción endotelial predice la diabetes tipo 2 en mujeres, como un factor de riesgo independiente de la obesidad o de la inflamación subclínica [Meigs y col., 2004].

Un segundo mecanismo compartido por la resistencia a la insulina y la disfunción endotelial, es la lipotoxicidad causada por altas concentraciones de ácidos grasos libres en situaciones de diabetes, obesidad y dislipidemia [Steinberg, H. O. y Baron 2002]. Además, se han asociado los estados proinflamatorios con enfermedades metabólicas y cardiovasculares [Aggoun 2007]. Así, unos niveles circulantes altos de MCP-1, VCAM-1 y PAI-1 en pacientes con diabetes tipo 2, tendrían un papel clave en el desarrollo de la enfermedad vascular en dichos pacientes [Cipollone y col., 2005; Kohler y Grant 2000; Rask-Madsen y col., 2010].

6. RESISTENCIA A LA INSULINA Y DAÑO CARDÍACO

En los últimos años ha aumentado la prevalencia de la obesidad y de las enfermedades metabólicas relacionadas con ella, como el síndrome metabólico y la diabetes tipo 2, en las sociedades occidentales [Haffner, S. y Taegtmeier 2003]. Un efecto subyacente en los individuos aquejados de las patologías citadas, es la resistencia a la acción de la insulina [Saltiel 2001] y el daño cardiovascular, siendo éste una de las principales causas de muerte en la población con enfermedad cardiovascular. La diabetes también está asociada con una aterosclerosis avanzada que afecta a las arterias que abastecen al corazón y cerebro. Como resultado, los pacientes con diabetes tienen un riesgo mucho mayor de infarto miocárdico y de apoplejía. A lo

largo de varios estudios clínicos se ha demostrado una fuerte relación entre la glucemia y las complicaciones microvasculares, tanto en diabetes tipo 1 como tipo 2 [Diabetes Trial Research Group 1993; Estudio UKPDS 1998]. Por lo tanto, la hiperglucemia y la resistencia a la acción de la insulina parecen tener un importante papel en el desarrollo de las complicaciones patogénicas macrovasculares [Wei y col., 1998; Ebara y col., 2000]. Sin embargo, poco se sabe sobre el impacto de la resistencia a la acción de la insulina en la función cardíaca.

El metabolismo cardíaco está regulado por la disponibilidad de sustrato, hormonas (insulina), el trabajo cardíaco (demanda de energía) y el aporte de oxígeno. Dada la importancia de la función contráctil continua, no es sorprendente que el corazón haya sido descrito como un órgano que puede utilizar muchos sustratos diferentes para generar ATP bajo diversas situaciones fisiológicas y fisiopatológicas [Depre y col., 1999]. Como es de suponer, la diabetes tiene una marcada influencia en el metabolismo cardíaco debido a que el aporte de sustratos se encuentra alterado, la acción de la insulina se ve afectada, y existen mal - adaptaciones metabólicas en el corazón diabético [Taegtmeyer y col., 2002; Young y col., 2002].

La diabetes produce un marcado incremento en la enfermedad cardíaca debido en parte a la cardiomiopatía diabética, definida como una disfunción ventricular producida en ausencia de enfermedad coronaria o hipertensión. La patogénesis de la cardiomiopatía diabética es indudablemente multifactorial. Se ha propuesto que alteraciones en el metabolismo energético cardíaco (como el metabolismo de la glucosa y de los ácidos grasos) serían uno de los mecanismos implicados [Jagasia y McNulty 2003].

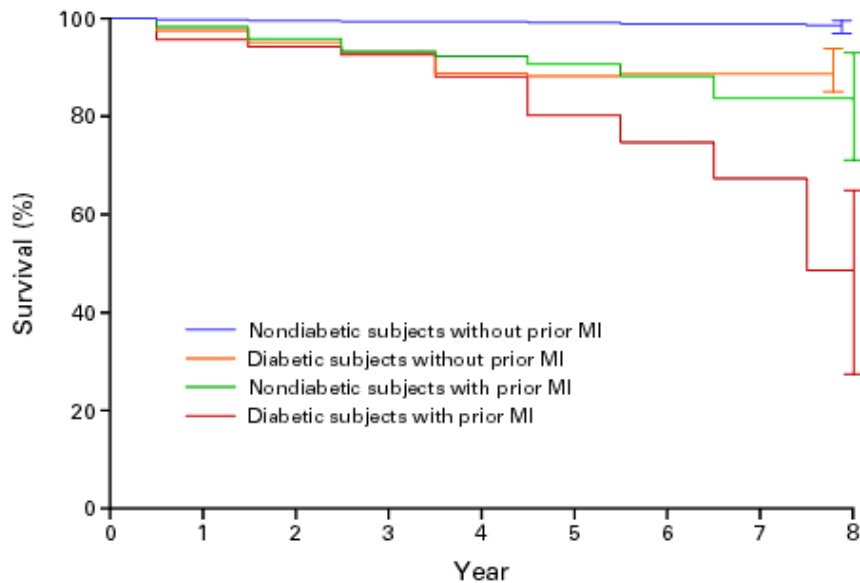


Figura 11. La diabetes es un factor de riesgo elevado para la enfermedad cardiaca. Los pacientes diabéticos sin un episodio previo de infarto de miocardio (MI), en naranja, tienen la misma probabilidad de supervivencia que aquellos que no eran diabéticos y habían tenido un MI previo (en verde). Como era de esperar, los de peor pronóstico son aquellos que sufrían diabetes y episodios previos de MI [Haffner, S. M. y col., 1998].

Los primeros estudios acerca de la forma en que la diabetes altera el metabolismo cardiaco fueron llevados a cabo principalmente en modelos de diabetes tipo 1 deficientes en insulina. Se observó un descenso de la asimilación de glucosa, de la tasa de glucólisis y de la oxidación de la glucosa; de forma que los corazones de pacientes con diabetes tipo 1 son casi exclusivamente dependientes de la oxidación de los ácidos grasos para la obtención de energía [Taegtmeyer y col., 2002; Young y col., 2002]. En comparación, se han realizado muy pocos estudios sobre el impacto que causa la diabetes tipo 2 en el metabolismo cardiaco. Se supone que existe un incremento en la utilización de ácidos grasos como sustrato para la obtención de ATP y que ello podría tener consecuencias deletéreas, siendo un posible mecanismo de cardiomiopatía diabética [Severson 2004].

Tanto la hiperglucemia como la hiperinsulinemia aumentan el riesgo de enfermedad cardiovascular fatal, en forma de enfermedad coronaria arterial prematura y acelerada. Además, los pacientes con diabetes muestran cambios en la estructura cardiaca y la ultraestructura de los cardiomiocitos, que plausiblemente pueden ser atribuidos al ambiente diabético.

La hiperglucemia promueve la formación de especies reactivas de oxígeno como una reacción producto de la glicosilación de proteínas. De esta forma, la hipertensión y la diabetes podrían promover de forma sinérgica la pérdida de cardiomiocitos por apoptosis. En pacientes con diabetes, el desarrollo de hipertensión puede ser esperado como un mecanismo de transición hacia la compensación.

La asimilación de glucosa por el músculo (cardíaco y esquelético) está determinada principalmente por 2 factores independientes pero interrelacionados, a saber, las concentraciones locales de insulina y la intensidad del ejercicio/contracción. Los ácidos grasos no esterificados (NEFAs) modulan el transporte de glucosa mediado por insulina e inhiben la oxidación de glucosa en mayor medida que la asimilación de glucosa por el corazón [Randle y col., 1963]. Sin embargo, la glucosa suprime la oxidación de ácidos grasos de cadena larga [Taegtmeyer y col., 1980], a través de la inhibición de la carnitina palmitoiltransferasa I por malonil-CoA [Saha y col., 1997].

La secreción de insulina estimula la asimilación de glucosa en los miocitos por aumento de la translocación del transportador de glucosa GLUT-4 hacia la membrana plasmática. Además, la insulina inhibe la liberación de NEFAs desde el tejido adiposo. Así, disminuyen las concentraciones plasmáticas de los ácidos grasos y por lo tanto se previene la inhibición de la glicólisis y la oxidación de piruvato mediada por NEFAs, así como el efecto inhibitorio de los mismos en la señalización de insulina. La magnitud del consumo de glucosa observada con algunas concentraciones de insulina *in vivo* se verá reducida a medida que aumentan las cantidades circulantes de NEFAs. Este principio de competición de sustratos entre glucosa y NEFA es tan conocido, que inicialmente los investigadores asumieron incorrectamente que la diabetes tipo 2 era secundaria a una elevación crónica de los niveles de NEFAs en el plasma [DeFronzo 1988]. La supresión de la oxidación de glucosa por los ácidos grasos, sin embargo, es sólo un componente más de un complejo sistema de interacciones metabólicas.

La oxidación de los ácidos grasos y la de glucosa están estrechamente interrelacionadas. Los ácidos grasos son capaces de inhibir la utilización de glucosa de forma aguda, como describieron Randle y col. en 1963. En cambio, la glucosa es capaz de inhibir la oxidación de ácidos grasos en el corazón y en el músculo esquelético, preferentemente a través de la elevación de las cantidades intracelulares de malonil-CoA. Las evidencias existentes también sugieren que elevaciones sostenidas en el tiempo de la disponibilidad de glucosa podrían bloquear la utilización de ácidos grasos a nivel de la expresión génica. La glucosa podría, por lo tanto, descender la

asimilación de ácidos grasos no sólo a través de la expresión de PPAR α , sino también a través de la activación de factores de transcripción que se unen al promotor de los genes del metabolismo de los ácidos grasos.

En diabetes, el corazón está expuesto a un ambiente hiperinsulinémico e hiperglucémico. Inicialmente, se adapta a este ambiente incrementando la expresión de proteínas del metabolismo de ácidos grasos, de esta forma aumenta su dependencia de los ácidos grasos como combustible. Este corazón adaptado es capaz de mantener la producción cardiaca bajo estas condiciones. Sin embargo, cabría la posibilidad de que una exposición continuada a este ambiente metabólico pudiera conducir a una disfunción cardiaca. A medida que la diabetes progresa, la excesiva disponibilidad de ácidos grasos y lípidos podría exceder la tasa de uso por el corazón, produciendo una acumulación lipídica en los cardiomiocitos. Esta acumulación en las células también ocurre en páncreas y está asociada con un fenómeno conocido como lipotoxicidad [Lee y col., 1994; Zhou y col., 2000]. Se ha formulado la hipótesis de que un exceso de lípidos y ácidos grasos, a través de acil-CoA de cadena larga, provocaría un aumento de las ceramidas intracelulares que más tarde induciría la acumulación de ROS, iNOS y apoptosis. La menor dependencia de los ácidos grasos como sustrato del corazón hipertrofiado en un medio diabético precipitaría la deposición lipídica en los cardiomiocitos, y por lo tanto aceleraría la lipotoxicidad.

Al igual que una acumulación lipídica intracelular excesiva es dañina, una acumulación excesiva de metabolitos de glucosa también lo es y está asociada con varias patologías. La asimilación de glucosa excesiva induce resistencia a la acción de la insulina en muchos órganos, incluyendo músculo esquelético, hígado y tejido adiposo. Junto con la resistencia a la acción de la insulina inducida por glucosa, el corazón diabético tiene una menor sensibilidad a la insulina. La hiperglucemia crónica está asociada con productos finales de la glicosilación (AGE) y la generación de ROS [Rosen y col., 1998].

7. OBESIDAD Y DAÑO CARDIOVASCULAR

La resistencia a la acción de la insulina puede estar relacionada con anomalías genéticas en unos pocos individuos, pero en la mayoría parece relacionarse con obesidad, particularmente con obesidad central o visceral. Varios estudios, sugieren que la resistencia a la insulina en muchos pacientes con diabetes tipo 2 es el resultado de un incremento en la adiposidad visceral [Lemieux y col., 1996;

Banerji y col., 1997]. Se ha hipotetizado que la liberación directa de ácidos grasos libres y/u otros productos procedentes del tejido adiposo en la circulación portal y el hígado, podrían ser un mecanismo importante causando resistencia a la insulina.

Numerosos estudios clínicos y epidemiológicos han mostrado evidencias de que muchos factores metabólicos, cardiovasculares y antropométricos actúan juntos. Entre estos factores se encuentran: resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa, obesidad central, hipertensión, dislipemia (TGs altos, cHDL plasmático bajo, aumento en la proporción pequeñas LDL en plasma), aumento de PAI-1 en plasma y un aumento de la enfermedad aterosclerótica.

La relación entre resistencia a la insulina y/o hiperinsulinemia con aterosclerosis acelerada parece ser más una asociación que una relación casual. Estudios epidemiológicos han mostrado que existe una correlación entre las concentraciones plasmáticas de insulina y el desarrollo de enfermedad coronaria cardiaca en diabéticos y en aquellos que no lo son [Diabetes Trial Research Group 1993].

8. TEJIDO ADIPOSO Y SU IMPLICACIÓN EN DIABETES

El tejido adiposo se distribuye en distintas localizaciones en el organismo. Sus depósitos se encuentran principalmente a nivel subcutáneo, mesentérico, perigonadal, perirrenal y retroperitoneal.

Se diferencian dos tipos de tejidos adiposos: el tejido adiposo blanco (WAT) y el tejido adiposo pardo o marrón (BAT). Ambos tejidos están formados por adipocitos, pero presentan diferencias en coloración, morfología, distribución, genes y función.

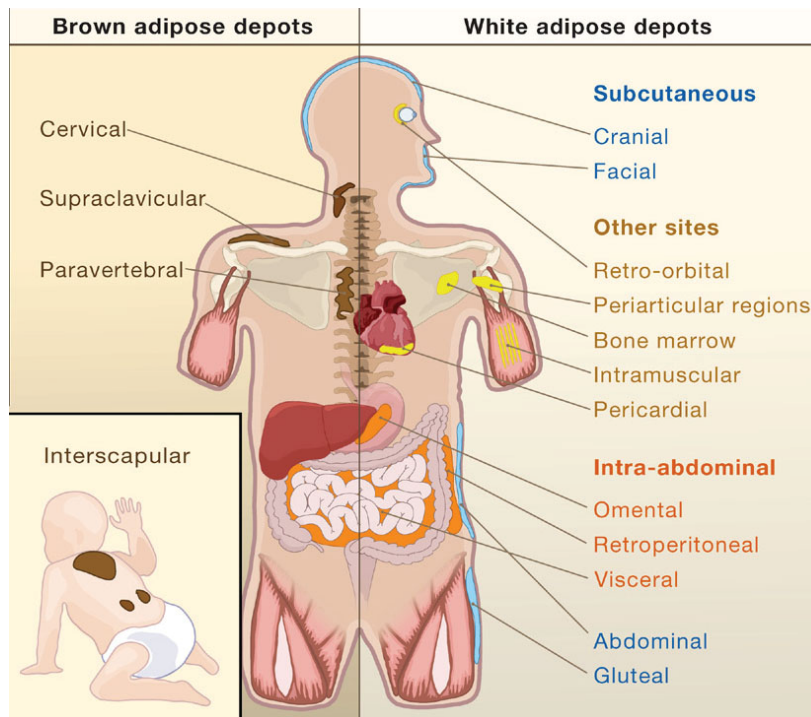


Figura 12. Localización de los depósitos de tejido adiposo en el cuerpo humano. A la izquierda, se representan las localizaciones del tejido adiposo marrón (cervical, supraclavicular, paravertebral y en neonatos también es interscapular). A la derecha, se pueden ver las localizaciones del tejido adiposo blanco que son mucho más numerosas [Adaptado de Gesta y col., 2007].

8.1. TEJIDO ADIPOSO BLANCO

El tejido adiposo blanco está formado por adipocitos, preadipocitos, células endoteliales, macrófagos, fibroblastos y leucocitos. Los adipocitos son uniloculares. Se encargan de acumular la grasa en forma de una enorme gota lipídica que ocupa la mayoría del citoplasma celular, desplazando el núcleo y los orgánulos hacia un extremo del adipocito (Figura 13).

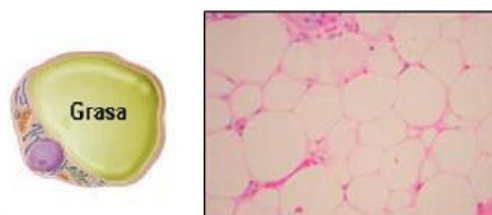


Figura 13. Tejido adiposo blanco. A la izquierda, se puede ver un esquema de la disposición del núcleo y de los orgánulos en un adipocito blanco repleto de la gota lipídica. A la derecha, se representa una microfotografía de un corte histológico del tejido adiposo blanco.

Cuando el organismo necesita energía, el tejido adiposo blanco lleva a cabo la lipólisis que consiste en la hidrólisis de los TGDs a ácidos grasos y glicerol, por la Lipasa sensible a hormonas (HSL) (Figura 14). Esta reacción de lipólisis es inhibida por la insulina.

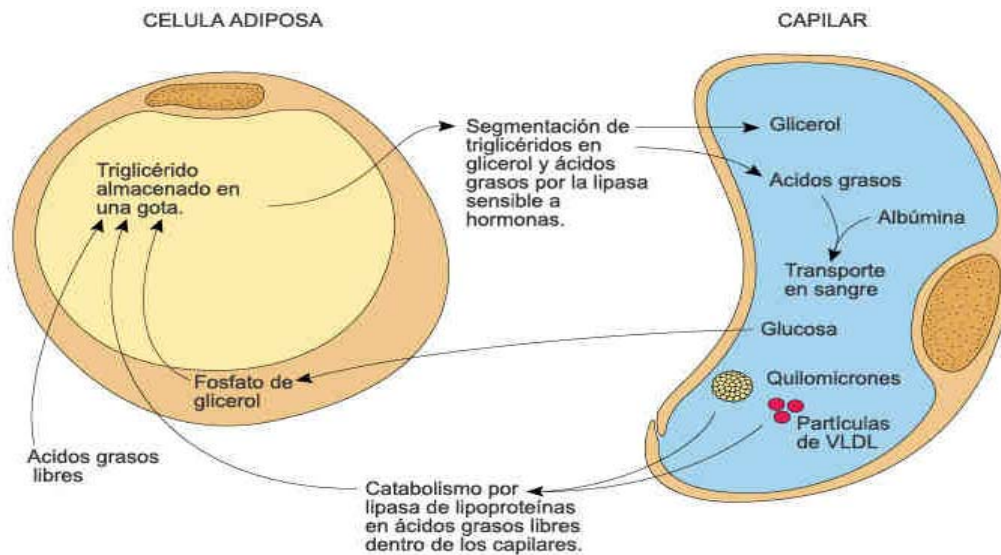


Figura 14. Esquema del transporte de lípidos entre un adipocito y un capilar. Las lipoproteínas sanguíneas son catabolizadas por la LPL y se transportan al adipocito donde se transforman en TGDs. Éstos, son hidrolizados por la HSL, y los ácidos grasos resultantes pasan al capilar. La glucosa sanguínea también puede penetrar en el adipocito, dando lugar a lípidos.

Durante mucho tiempo se pensó que la única función del WAT era la de reservorio energético, pero se ha ido poniendo de manifiesto la importancia de este tejido como órgano secretor, produciendo sustancias que actuarán endocrina, paracrina y autocrinamente [Fruhbeck y col., 2001]. Entre las sustancias secretadas por el WAT se encuentran moléculas implicadas en la regulación del peso corporal (leptina y adiponectina), en la inflamación (TNF- α , IL-1, IL-6, MCP-1), en la función vascular (PAI-1), en la resistencia a la insulina (insulina) y en la función reproductora (estrógenos).

La leptina actúa en el hipotálamo inhibiendo el apetito [Inui 1999], pero también realiza otras acciones a nivel periférico. Las concentraciones de leptina son proporcionales a las de insulina y regulan las células de los islotes pancreáticos [Park, S. y col., 2010]. Las citoquinas inflamatorias inducen la producción de leptina, al igual que los esteroides ováricos, mientras que los andrógenos masculinos la inhiben.

Cuando hay un descenso en la señalización de leptina o en la función de su receptor, se produce un aumento de la ingesta de comida y un descenso del gasto de energía, lo que produce obesidad, hiperfagia e hiperinsulinemia. En las personas obesas se encuentra un aumento de las concentraciones de leptina que se debe a una resistencia a la acción de esta adipoquina. Varios estudios han mostrado que altas concentraciones de leptina se correlacionan positivamente con índices de resistencia a la insulina, así como con elevadas concentraciones de citoquinas inflamatorias [Peti y col., 2010; Brito y col., 2010; Gnacinska y col., 2010].

Otra adipoquina secretada por el WAT es la adiponectina. Esta hormona induce la secreción de las moléculas vasculares VCAM-1 e ICAM-1 [Juge-Aubry y col., 2005]; tiene también un efecto antioxidante [Ouedraogo y col., 2006], aumenta la producción de NO y realiza una función protectora sobre la vasculatura mediante la reducción de la agregación plaquetaria y la vasodilatación [Matsuo y col., 2007; Ouchi y col., 2003b]. Al contrario que la leptina, la adiponectina tendría un efecto antiinflamatorio [Gnacinska y col., 2010]. Por sí misma, la adiponectina tendría un efecto antiaterosclerótico, actúa como un factor antitrombótico e inhibe la activación de macrófagos y la acumulación de células espumosas [Ouchi y col., 2003a; Kato y col., 2006; Wang, Y. y col., 2005]. De hecho, patologías como la aterosclerosis, la enfermedad coronaria cardiaca y la resistencia a la insulina, se han relacionado con un descenso en las concentraciones de adiponectina [Trujillo y Scherer 2005].

De las citoquinas secretadas por el WAT, la más importante sería TNF- α debido a la función reguladora que ejerce sobre el resto, ya que estimula su producción y liberación. Además desciende las concentraciones de adiponectina y leptina y facilita la disfunción endotelial y la aterogénesis [Wang, B. y Trayhurn 2006; Hector y col., 2007; Mateo y col., 2007]. El TNF- α es un estimulante de la lipólisis e inhibe la LPL en lo que podría considerarse como un mecanismo para reducir el tamaño excesivo de los depósitos de grasa [Cruz-García y col., 2009]. Sin embargo, altas concentraciones de TNF- α en el WAT estarían implicadas en la resistencia a la insulina que aparece en personas obesas, ya que se sabe que inhibe la ruta de señalización de dicha hormona [Hotamisligil y col., 1994].

El PAI-1 secretado por el WAT aumenta cuando se desarrolla la resistencia a la insulina y se ha relacionado con trombosis y aterosclerosis en pacientes diabéticos (ver apartado 4.5.5).

Las quimioquinas producidas por el WAT (IL-8, MCP-1, etc.) están reguladas por adipoquinas como la leptina [Laing y Secombes 2004]. MCP-1 es un mediador del reclutamiento de linfocitos y monocitos. Su secreción se ve aumentada por leptina, obesidad y hormonas que inducen resistencia a la insulina [Kralisch y col., 2007]. MCP-1 está asociada con la enfermedad aterosclerótica (ver apartado 4.5.2).

En resumen, el aumento de la masa adiposa visceral (dónde se localiza la mayoría del WAT) es un factor de riesgo para el desarrollo de resistencia a la insulina, síndrome metabólico, diabetes tipo 2 y enfermedad cardiovascular.

8.2. TEJIDO ADIPOSO MARRÓN

El tejido adiposo marrón o BAT está formado por adipocitos multiloculares (es decir, acumulan los TGDs en forma de varias gotas de grasa) con numerosas mitocondrias. De hecho estos adipocitos junto con los cardiomiocitos, son las células del organismo con mayor número de mitocondrias [Napolitano y Fawcett 1958; Cinti 2000]. Además, el BAT está muy vascularizado y enervado (Figura 15).

Este tejido se encuentra sobre todo en pequeños mamíferos y en neonatos humanos. Se encarga de disipar calor, siendo responsable de la termogénesis, función que realiza mediante la proteína desacoplante 1 (UCP-1) (ver apartado 9).

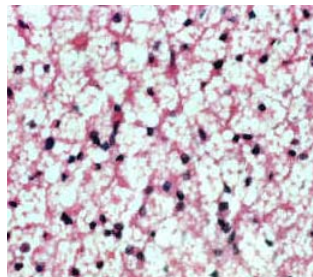


Figura 15. Microfotografía del tejido adiposo marrón teñido con tricrómico de Masson. Se pueden observar las múltiples gotas de grasa que ocupan su citoplasma, así como los núcleos celulares.

Recientemente se han mostrado evidencias de que el tejido adiposo marrón, además de su papel en la termogénesis sin tiriteo, podría ser un tejido que consumiera tanta energía como para influir en la grasa corporal y en el riesgo de obesidad y diabetes [Cypess y col., 2009; Wijers y col., 2009].

La termogénesis se realiza en respuesta a bajas temperaturas y otros factores que estimulan el sistema nervioso simpático. Entonces se pone en marcha la lipólisis

mediante la activación de la HSL. Los ácidos grasos libres (AGL) se unen a su proteína de unión (FABP) y se transfieren a la mitocondria por la activación del sistema lanzadera de carnitina. A continuación, los AGL sufren la β -oxidación y junto con el ciclo del ácido cítrico, generan poder reductor en forma de FADH y NADPH, y estos se oxidan en la cadena transportadora de electrones. Como resultado, los protones son lanzados a través de la bomba de protones de la membrana mitocondrial para formar el gradiente que permite que UCP-1 conduzca estos protones de vuelta a la matriz mitocondrial en un proceso que genera calor [Rousset y col., 2004]. La forma en que los AGL activan UCP-1 todavía no está clara, se cree que podrían funcionar como cofactores, reguladores alostéricos o lanzaderas de protones.

El hecho de que el BAT esté muy vascularizado, maximiza la transferencia de calor a los tejidos perfundidos por la sangre que circula a través del BAT, incluyendo órganos vitales y el sistema nervioso [Smith, R. E. y Roberts 1964]. Esta vascularización se ve aumentada en respuesta a bajas temperaturas mediante un mecanismo que implica la estimulación de la angiogénesis por activación del sistema nervioso simpático [Asano y col., 1997]. Además, se ha publicado que la insulina podría estimular el crecimiento de capilares en el BAT de ratas expuestas a altas temperaturas [Yamashita y col., 1992].

La obesidad es un desequilibrio entre la ingesta y el gasto de energía. El hecho de que se genere calor a expensas de la energía necesaria para mantener la masa corporal, podría ser crítico para la supervivencia durante largos periodos de escasez. Por lo tanto, sería esperable que especies e individuos con pequeñas cantidades de BAT estuvieran predispuestos a una excesiva ganancia de peso en condiciones de gran disposición de nutrientes.

De hecho, se le ha reconocido al BAT su potencial y demostrada capacidad "antiobesidad". Determinado tipo de dietas que producen hiperfagia en roedores (las llamadas "dietas de cafetería") estimulan la expansión y activación de la "grasa parda", en un aparente esfuerzo fisiológico por contener la ganancia de peso y el desarrollo de la obesidad, en un fenómeno denominado termogénesis inducida por la dieta [Rothwell y Stock 1979]. Cuando se elimina genéticamente el BAT, mediante la expresión de una toxina dirigida a ese tejido, se produce una predisposición a la obesidad y a la enfermedad metabólica [Lowell y col., 1993]. Asimismo, la delección de UCP-1 en ratones, provoca un aumento en la ganancia de peso, siempre que se les mantenga a temperaturas templadas [Feldmann y col., 2009]. De hecho, se ha

demostrado de forma clara que UCP-1 es un factor clave en la termogénesis inducida por la dieta. Además, un amplio número de estudios genéticos en ratones han mostrado que aumentos experimentales en la cantidad y/o función de grasa marrón promueven un fenotipo delgado y saludable [Kopecky y col., 1995; Kopecky y col., 1996; Cederberg y col., 2001; Tsukiyama-Kohara y col., 2001; Xue y col., 2007]. Específicamente, ratones con altas cantidades de BAT ganan menos peso, son más sensibles a la insulina, tienen niveles más bajos de ácidos grasos libres en suero y están protegidos contra la diabetes y otras enfermedades metabólicas. Finalmente, la estimulación de la termogénesis mediada por el BAT en animales adultos mediante tratamiento farmacológico con agonistas β -adrenérgicos o agonistas de los receptores tiroideos, reduce la obesidad, pero estos agentes tienen demasiados efectos secundarios no deseados para utilizarlos como tratamiento clínico [Arch 2002].

9. PROTEÍNAS DESACOPLANTES (UCPs) Y DIABETES

Las UCPs o proteínas desacoplantes son una familia de proteínas transportadoras que proporcionan medios alternativos para la reentrada de protones desde el espacio intermembrana a la matriz mitocondrial, y que no está acoplada a la síntesis de ATP. Se ha demostrado que estas proteínas de unión a la membrana mitocondrial interna, desacoplan la síntesis de ATP del metabolismo oxidativo, por consiguiente disipan energía en forma de calor [Rousset y col., 2004].

Se han descrito varios homólogos (UCP-1, -2, -3, -4 y -5), pero los más conocidos son los tres primeros. UCP-1 se expresa principalmente en el tejido adiposo marrón, donde está envuelta en la termogénesis sin tiriteo, se encarga de disipar la energía en forma de calor. UCP-2 se expresa de forma ubicua, minimiza la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) derivadas de las mitocondrias [Duval y col., 2002; Paradis y col., 2003]. UCP-3, por otro lado, muestra una distribución tisular más limitada, encontrándose muy expresada en tejidos con alta capacidad de β -oxidación de los ácidos grasos, como el tejido adiposo marrón, el músculo esquelético y el corazón [Hesselink y col., 2003; Rousset y col., 2004; Schrauwen y col., 2003].

Debido a sus funciones metabólicas, las tres están íntimamente relacionadas con la diabetes y el desarrollo de resistencia a la insulina. En estudios realizados en ratones transgénicos a los que se había causado una atrofia del BAT, se puso de manifiesto la importancia de UCP-1. Estos ratones sin BAT presentaban una ganancia de peso muy elevada y desarrollaban enfermedades relacionadas con la obesidad como son la

resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, hiperglicemia e hiperlipidemia, es decir, el cuadro sintomático típico de la diabetes tipo 2 [Hoag y col., 1995; Lowell y col., 1993].

UCP-2 tiene una expresión ubicua, por lo tanto, se expresa en células β del páncreas. La sobre-expresión de esta proteína causa la supresión total de la secreción de insulina estimulada por glucosa en los islotes pancreáticos [Chan y col., 1999]. De la misma forma, en ratones carentes de UCP-2 se ha observado un aumento de la secreción de insulina en los islotes pancreáticos que se corresponde con una mayor concentración de insulina plasmática y unos niveles de glucosa más bajos [Zhang y col., 2001]. Estos resultados se vieron confirmados mediante la supresión de expresión de la proteína en dos modelos animales de diabetes y resistencia a la insulina, donde la ausencia de UCP-2 causaba un aumento significativo de la secreción de insulina y mejoraba la sensibilidad a la insulina en todo el organismo [De Souza y col., 2007]. Así, además de propiciar el fenotipo diabético por el aumento de la secreción de insulina, el descenso de la expresión de UCP-2 aumenta la resistencia a la insulina en los tejidos periféricos, como el tejido adiposo blanco [De Souza y col., 2003]. Además, parece ser que UCP-2 establecería un vínculo entre el exceso de ácidos grasos y una peor secreción de insulina en respuesta a la glucosa, ya que una exposición crónica de las células β pancreáticas a los ácidos grasos, provocaría un aumento de la expresión de UCP-2 que a su vez causaría un descenso de la respuesta de la célula β a la acción de la glucosa y una menor secreción de insulina. Así, se establecería una relación entre obesidad y diabetes tipo 2 [Lameloise y col., 2001]. Sin embargo, también existen numerosos estudios en los que se muestra que UCP-2 atenúa el estrés oxidativo y por lo tanto, promovería la supervivencia en las células α y β del páncreas [Diao y col., 2008; Emre y col., 2007] y en neuronas [Paradis y col., 2003]. Además, se ha descrito que UCP-2, a través de la regulación del estrés oxidativo, confiere protección frente a la aterosclerosis [Blanc y col., 2003] incluso en pacientes diabéticos e hipertensos [Park, J. Y. y col., 2005] y en modelos de dieta rica en grasas y colesterol [Moukdar y col., 2009].

Las funciones de UCP-3 incluyen la regulación del metabolismo de ácidos grasos [Bezaire y col., 2005], del estado redox y de la formación de ROS [Korshunov y col., 1998], aunque la función principal de UCP-3 parece ser la de conferir protección a la mitocondria frente a la lipotoxicidad [Nabben y Hoeks 2008]. Se ha observado que los ratones que sobreexpresan UCP-3 de forma constitutiva presentan una “resistencia” al desarrollo de obesidad inducida por la dieta, además de estar protegidos frente a la resistencia a la insulina [Son y col., 2004]. El hecho de que UCP-3 se exprese

fundamentalmente en el músculo esquelético, que éste sea el tejido periférico mayoritario y que la principal causa de la diabetes tipo 2 sea la resistencia a la insulina periférica [Chan y Harper 2006], implica que UCP-3 se considere una posible diana terapéutica para la enfermedad, ya que podría tratarse la resistencia a insulina en el músculo esquelético disipando energía de la reserva de grasa. Se ha observado que en pacientes diabéticos a los que se les administró rosiglitazona (agonista de PPAR utilizado en el tratamiento de la resistencia a la insulina) se produjo un aumento de la expresión de UCP-3 y una mejora de la resistencia a la insulina [Schrauwen y col., 2006].

10. ENVEJECIMIENTO, RESISTENCIA A LA INSULINA Y DAÑO CARDIOVASCULAR

El envejecimiento es un proceso fisiológico progresivo, deletéreo y que implica a todo el organismo.

La estimación de envejecimiento se puede hacer por varios parámetros aparte de la edad, como son: manifestaciones metabólicas reveladas en los niveles sanguíneos de colesterol total, cHDL, cLDL, secreción de insulina e índice de masa corporal (BMI). Todos estos parámetros están estrechamente relacionados con el síndrome metabólico.

Como hemos dicho antes, el envejecimiento es un proceso de todo el organismo, pero no todos los órganos envejecen sincrónicamente. De hecho, hay órganos que muestran cambios tempranos, como la piel y los huesos, mientras que otros, especialmente el cerebro, envejecen más tardíamente.

Entre las manifestaciones del envejecimiento se encuentran:

- **Hipercolesterolemia:** aumentan los niveles sanguíneos de colesterol total y cLDL, mientras que la cantidad de cHDL disminuye a medida que avanza la edad [Kaplan y col., 2010; Peterson y col., 2010]
- **Hiperglucemia:** desde hace años se sabe que los individuos ancianos tienen una peor tolerancia a los glúcidos [Davidson 1979; Crockford y col., 1966]. De hecho, la edad desempeña un papel principal en el desarrollo de alteraciones del metabolismo de la glucosa.
- **Resistencia a la insulina e hiperinsulinemia:** está demostrado que la intolerancia a la glucosa relacionada con la edad a menudo está acompañada de resistencia a la insulina, aunque no siempre se detecta un aumento de los

niveles circulantes de insulina [Chang y Halter 2003]. Sin embargo, se esperaría una hipersecreción compensatoria de la hormona.

- **Obesidad:** podría deberse a una alteración en la regulación del peso corporal, causada por la resistencia a la leptina [Zoico y col., 2010]. La obesidad no sólo se relaciona con la edad, pero acelera las tasas de envejecimiento y disminuye la esperanza de vida. Así que, dependiendo del grado, podría decirse que la obesidad acorta la esperanza de vida [Fontaine y col., 2003]. A medida que se avanza en la edad adulta se produce un aumento de la masa grasa principalmente visceral, que está estrechamente relacionada con el descenso de la acción hepática de la insulina [Barzilai 1999]. Esto está probablemente relacionado con un fallo del efecto de la leptina, lo que fundamentalmente parece ser dependiente de la edad.
- **Aterosclerosis:** junto con un aumento de la glucemia en el ayuno y una peor tolerancia a glucosa, su prevalencia se correlaciona positivamente con la edad, aunque la intolerancia a la glucosa parece estar especialmente asociada con una mayor incidencia de enfermedad coronaria cardíaca [Blake y col., 2004]. Sin embargo, es probable que la actividad aterogénica de la intolerancia a la glucosa sea debida a una resistencia a la insulina simultánea [Festa y col., 2004]. La edad representa un factor de riesgo muy importante para la enfermedad cardiovascular. Además, hay que tener en cuenta que la vida de las células es limitada, y poco antes de su muerte entran en un proceso llamado senescencia. Las células en dicho estado son viables, metabólicamente activas pero tienen una expresión génica y proteica alterada; así las células endoteliales senescentes están relacionadas con el desarrollo de aterosclerosis [McEwen y col., 2005]. El envejecimiento también está relacionado con el aumento del estrés oxidativo y la disfunción endotelial [Brandes y col., 2005; Di Massimo y col., 2006; Brown y col., 2007]. El envejecimiento y otros factores de riesgo ateroscleróticos parecen regular al alza las rutas que aumentan la producción de ROS, mientras que se ha mostrado que los mecanismos antioxidantes pueden reforzarse o disminuir con la edad [Csiszar y col., 2007; Dasari y col., 2006; Kishido y col., 2007; Kuro-o 2008].

Objetivos

En las sociedades occidentales se ha producido un aumento de la prevalencia de la obesidad y de las enfermedades metabólicas relacionadas con ella, tales como el síndrome metabólico y la diabetes tipo 2 [Haffner, S. y Taegtmeyer 2003]. Los individuos aquejados de las dolencias citadas, sufren los efectos de la resistencia a la acción de la insulina [Saltiel y Kahn 2001] y del daño cardiovascular, y éste es una de las principales causas de muerte en la población con enfermedad cardiovascular. La diabetes también está asociada con una aterosclerosis avanzada que afecta a las arterias que abastecen a corazón y cerebro. Como resultado, los pacientes diabéticos tienen un riesgo mucho mayor de infarto miocárdico y cerebral. Además, la población humana cada vez es más longeva. Así, todos estos problemas de salud se ven agravados por los efectos deletéreos del envejecimiento. Sin embargo, en el último año han aparecido evidencias de la posible función frente a estas complicaciones, sobre todo en los pacientes de edad avanzada, de un tejido hasta ahora poco relevante en el ser humano adulto, como es el tejido adiposo marrón [Cypess y col., 2009].

Por esta razón, hemos querido estudiar los efectos que una dieta rica en grasas y el envejecimiento causan en el organismo, respecto a la resistencia a la insulina y su efecto en el desarrollo de la lesión vascular. Además del papel que el tejido adiposo marrón puede tener en estas patologías, se han analizado los mecanismos moleculares que pueden estar implicados. Para ello, nos hemos planteamos los siguientes objetivos:

1. Estudiar el papel diferencial del desarrollo o no de los mecanismos compensatorios frente a la resistencia a la insulina asociada a la obesidad en la lesión vascular.
2. Estudiar la posible implicación del tejido adiposo marrón asociado con el envejecimiento en el desarrollo de la lesión vascular.
3. Analizar los mecanismos moleculares implicados en la resistencia a la insulina ocasionada por la exposición a ácidos grasos en dos modelos cardiovasculares *in vitro*.

Material y Métodos

1. ESTUDIOS EN LOS MODELOS EXPERIMENTALES

Para la realización de este trabajo se utilizaron los siguientes ratones: *wild type*; ratones con el exón 4 del Receptor de Insulina (IR) flanqueado por secuencias LoxP (IRLoxP/LoxP); ratones transgénicos que expresan la recombinasa Cre bajo el promotor de *UCP-1* (UCP-1-Cre) y ratones que presentan el gen del IR inactivado específicamente en el tejido adiposo marrón (BATIRKO).

Nuestros ratones fueron mantenidos en condiciones estándar de luz (ciclos luz/oscuridad de 12 horas, 8:00-20:00/20:00-8:00), temperatura (23,3°C) y humedad (65,1%) durante todo el periodo experimental. Todas las manipulaciones con animales se realizaron entre las 9:30 y 12:30 horas, de acuerdo con las Normativas Internacionales para el uso y manejo de animales de laboratorio aprobadas por el *National Research Council* (Washington, 1996), la Directiva Europea 86/609 CEE y bajo las normas previstas por el Comité Ético de la Universidad Complutense de Madrid.

Los animales se encontraban separados por genotipos. Se dividieron en dos grupos: **Control** (formado por LoxP/LoxP y fenotipo *wild type* y denominado **C**) y **BATIRKO** (genotipo UCP-1-Cre; LoxP/LoxP, y denominado **B**).

1.1. DISEÑO DEL MODELO EXPERIMENTAL DE RESISTENCIA A LA INSULINA ASOCIADO A OBESIDAD (BATIRKO OBESO)

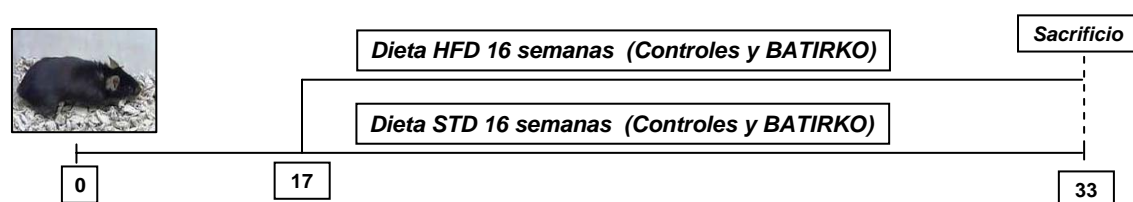


Figura 16. Esquema del modelo experimental de obesidad.

A las 17 de semanas de edad aparece el fenotipo BATIRKO. En ese momento, los animales de ambos grupos (C y B) se separaron a su vez en otros dos, dependiendo de la alimentación que fueran a recibir (Figura 16).

El grupo de **Dieta Estándar (STD)** recibió una dieta estándar de mantenimiento, no purificada, específica para roedores (Panlab A04), con un valor energético de 2,9 kcal/g y

1.3.2. Obtención de ratones IR LoxP/LoxP

Los ratones LoxP/LoxP, son ratones transgénicos derivados del linaje 129Sv, C57Bl/6 y FVB, que tienen el exón 4 del gen del receptor de insulina flanqueado por secuencias LoxP utilizando el sistema de recombinación Cre/LoxP del bacteriófago P1. Este sistema permite flanquear el gen diana con secuencias LoxP introducidas mediante recombinación homóloga. Mediante la expresión de la recombinasa Cre se puede inactivar el gen flanqueado por las secuencias LoxP.

Estos ratones se obtuvieron a partir del cruce de ratones heterocigotos LoxP/+. Una vez que las crías nacidas de este cruce cumplieron 3 semanas de vida, se destetaron y se les cortó una pequeña porción de la cola para obtener y purificar el ADN y así realizar el genotipaje.

1.3.3. Obtención de los ratones carentes del IR de forma tejido específica en el tejido adiposo marrón (BATIRKO)

El ratón BATIRKO se generó a partir de cruces sucesivos del ratón transgénico UCP-1-Cre e IR LoxP/LoxP. De esta forma se obtuvieron ratones IRLoxP/LoxP-UCP-1-Cre que presentaron una delección del receptor de insulina específica en el tejido adiposo marrón. En el resto de tejidos, este receptor hormonal se expresó de forma normal.

1.3.4. Purificación del ADN de la cola de ratón

La porción de cola obtenida se introdujo en un tubo de 1,5 ml, se añadieron 300µl de un tampón constituido por Tris 50mM pH 8,0, EDTA 25 mM pH 8,0, NaCl 100mM, 1% SDS y Proteinasa K (20mg/ml) y se incubó a 55°C durante toda la noche para que tuviera lugar la digestión.

A la mañana siguiente, se añadió la misma cantidad de fenol saturado con TE pH 8,0 (Tris 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM pH 8,0) y se agitó durante 30-60 segundos en un vórtex. A continuación se centrifugaron los tubos a 12.000 rpm durante cuatro minutos.

Se recogió el sobrenadante en un tubo nuevo y se le añadió el mismo volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), agitando manualmente de forma suave durante 30-60 segundos. Posteriormente se realizó una nueva centrifugación a 12.000 rpm durante tres minutos.

Se recogió el sobrenadante nuevamente y se le añadió etanol absoluto frío, mezclando por inversión hasta que comenzó a precipitar el ADN. Cuando el ADN hubo precipitado, se retiró el etanol y se dejó secar durante 10-15 minutos. Una vez seco, el ADN se resuspendió en TE.

1.3.5. Genotipaje de los ratones por PCR

A partir del ADN, se amplificó la hebra obtenida por el método de reacción en cadena de la polimerasa o PCR para así conocer si los ratones obtenidos poseían el genotipo de interés.

Para comprobar si los ratones habían incorporado o no las secuencias de interés, se llevó a cabo una PCR con 150 ng de ADN, utilizando los *primers* descritos en la Tabla 3.

Genotipo	<i>Primers</i> (Secuencia) Sentido (S) Antisentido (AS)	Tm y nº ciclos
LoxP/LoxP	(S) 5' CCTAAGGTCTGCCAAATC 3' (AS) 5' TTAAAGCAATCCTCCTGCCTCAGCCT 3'	57°C 30 ciclos
UCP-1-Cre	UCP-1 (S) 5' GTCTGCACTGGCACTACCTA 3' UCP-1 (AS) 5' GGAGAAGCCTCATCAATGTCA 3' Cre (AS) 5' CCATCGCTCGACCAGTTTAGT 3'	54°C 32 ciclos

Tabla 3. *Primers* utilizados para el genotipaje de los ratones

Una vez amplificado el ADN, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 2% y se obtuvieron 3 patrones distintos:

- LoxP/LoxP: aparece una banda de 320 pares de bases (pb)
- LoxP/+: dos bandas, una de 320 y otra de 280 pb.
- +/+: una sola banda de 280 pb.

Los ratones BATIRKO presentaron el patrón descrito para LoxP/LoxP. Además, a los ratones BATIRKO junto con los UCP-1-Cre, se les realizó una segunda PCR para saber si presentaban la Cre-Recombinasa bajo el promotor de *UCP-1*. Para ello, se utilizaron los *primers* descritos en la tabla 3 y se obtuvieron dos patrones diferenciales:

- Presencia de UCP-1-Cre: tanto en el ratón BATIRKO como en el UCP-1-Cre aparecieron dos bandas de 600pb y 300pb. La primera de las bandas amplifica la Cre-recombinasa bajo el promotor de *UCP-1* y la segunda banda corresponde a una región interna del dicho promotor.
- Ausencia de UCP-1-Cre: los ratones *wild type* e IRLoxP/LoxP sólo presentaron una única banda de 300pb que corresponde con la región interna del promotor de *UCP-1*.

2. ESTUDIOS *IN VITRO*

2.1. CULTIVO PRIMARIO DE CARDIOMIOCITOS NEONATALES

Para la obtención de los cardiomiocitos de ratón, se procedió al cruce de ratones de genotipo *wild type* y de ratones con el receptor de insulina flanqueado por secuencias LoxP. Después del período de gestación, se tomaron los neonatos de un día, se sacrificaron mediante decapitación, se desangraron y se desinfectaron con etanol. Se les extrajo el corazón y a partir de ahí se procedió a trabajar en condiciones de esterilidad en una cabina de flujo laminar vertical.

El cultivo primario se realizó a partir de los corazones de los neonatos en grupos de tres. Se colocaron en un plato de plástico con PBS 1X para limpiar los restos de sangre que pudieran quedar en el tejido. Con ayuda de material quirúrgico estéril, se trocearon los corazones y se introdujeron en 1 ml de una solución de PBS 1x con 1,2 mg/ml de colagenasa (Colagenasa tipo 2, Worthington) y 10 µg/ml ADNasa (DNasa I grado II, Roche).

Para la disgregación del tejido, se incubó el tubo en un baño a 37°C, dentro de la cabina de flujo laminar, durante 10-20 min; tiempo durante el que se realizó un pipeteo suave y continuo para separar las células. Una vez hecho esto, se tomó el sobrenadante, desechando el tejido restante, y se añadieron entre 3-5 ml de suero fetal bovino estéril y filtrado con un filtro Millipore de 0,22µm de tamaño de poro.

A continuación, se centrifugaron los tubos con el suero fetal durante cinco minutos a 1000 rpm y 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células mediante un pipeteo suave, en 1 ml de medio apropiado para el cultivo de cardiomiocitos (DMEM y M199 (3:1), 5% de suero fetal bovino, 10% de suero de caballo, 20 mM de HEPES, 0,2

ng/ml de cardiotrofina-I (R&D Systems), 1 μ M de insulina (Sigma) y una mezcla de antibióticos y antifúngicos).

Posteriormente se sembraron las células durante 45 minutos para así eliminar los fibroblastos del sobrenadante ya que éstos se pegan con más facilidad. Pasado ese tiempo, el sobrenadante se sembró en platos previamente tratados con colágeno (*Collagen from rat tail*, Roche Applied Sciences) disuelto en una solución de PBS al 0,2% de ácido acético, para así facilitar la adhesión de los cardiomiocitos.

2.2. CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR DE AORTA DE RATÓN

Para obtener las células de músculo liso vascular de aorta de ratón, se necesitaron ratones de genotipo *wild type* y LoxP/LoxP de aproximadamente seis semanas de edad. Estos ratones se anestesiaron con Avertina® (12,5 mg de Tribromoethanol/ml, 250 mg/kg de peso del animal). Una vez que comprobamos la ausencia de reflejos ocular y pedal, se procedió a extraer la arteria aorta torácica del animal utilizando material quirúrgico estéril. Las aortas se colocaron en un tubo con PBS 1x estéril.

A continuación, dentro de campana, se procedió a la eliminación de todo aquel tejido que no perteneciera a la aorta, así como de la capa adventicia de la misma. Una vez las aortas limpias, se colocaron en placas de tres centímetros de diámetro que contenían una mezcla de medio y colagenasa (DMEM suplementado con 20 mM de HEPES y 4mg de colagenasa II/ml). Con un bisturí estéril se dividieron las aortas en secciones lo más pequeñas posibles y se incubaron a 37°C durante 45-60 minutos.

Transcurrido este tiempo se recogió el medio con los trozos de aorta y se centrifugaron a 900 rpm durante cuatro minutos. Se retiró el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino. El ciclo de centrifugación y resuspensión del precipitado se repitió tres veces más.

Después de la última centrifugación, se resuspendió el precipitado con medio y se sembró en placas. Este precipitado estaba compuesto de células de músculo liso de la pared vascular y explantes de aorta.

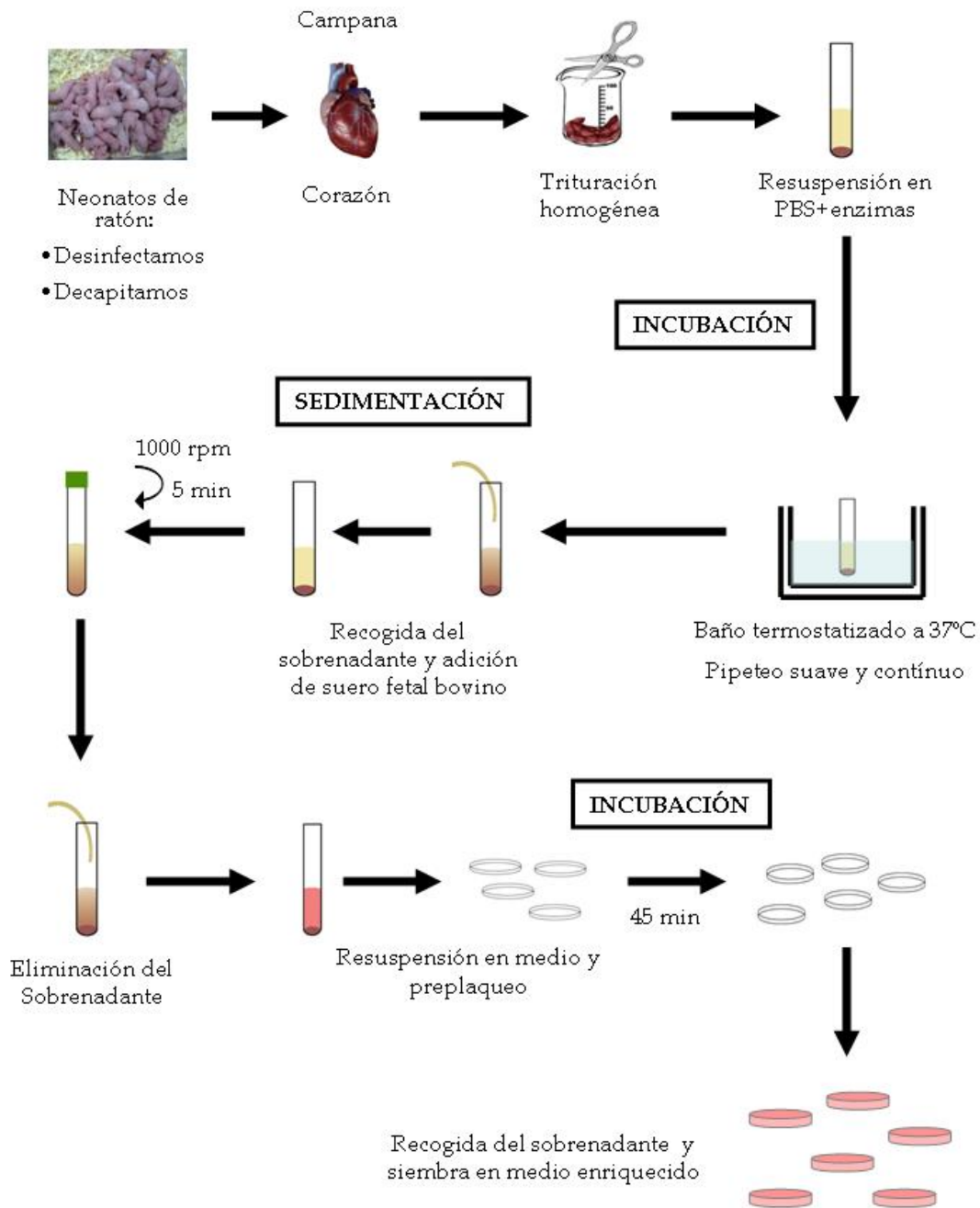


Figura 18. Esquema del cultivo primario de cardiomiocitos de ratón.

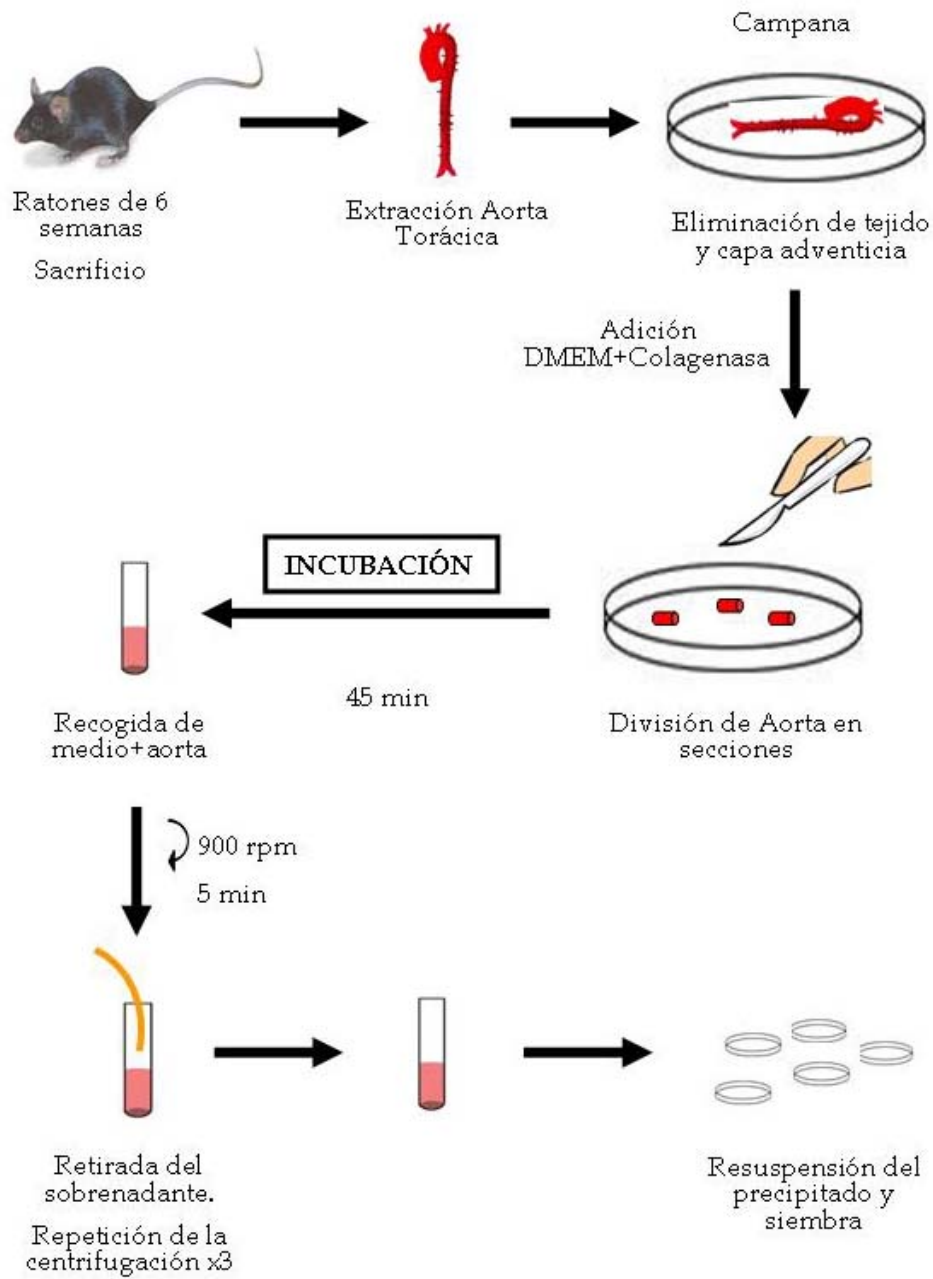


Figura 19. Esquema de cultivo primario de células de músculo liso vascular de ratón.

2.3. OBTENCIÓN DE LÍNEAS CELULARES DE CARDIOMIOCITOS Y DE CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR *WILD TYPE* E IR *LoxP*

Después de dos días de estabilización del cultivo primario en el caso de los cardiomiocitos y de que el plato llegara al 70-80% de confluencia en el caso de las células de músculo liso vascular, se procedió a la inmortalización de las células mediante infección con partículas retrovirales portadoras de la construcción pBABE puro-Antígeno T en presencia de (polibreno 8µg/ml). Esta polimerización favorece la entrada de las partículas virales al interior de la célula.

La proteína Antígeno T del virus del polisoma SV40, proporciona a las células la capacidad de propagarse indefinidamente y la inhibición del crecimiento celular por contacto tras alcanzar la confluencia.

Las células permanecieron en contacto con las partículas retrovirales durante 72 horas. Transcurrido este tiempo, se retiraron las partículas retrovirales y se procedió a la selección de las células infectadas con el antibiótico de selección, en este caso puromicina, a una concentración de 0,5 µg/ml, durante un tiempo de entre 2 y 3 semanas.

Durante el proceso de selección y clonaje, los cardiomiocitos se cultivaron en medio DMEM enriquecido con suero de caballo al 10%, suero fetal bovino al 5%, 20 mM de HEPES, 0,2 ng/ml de cardiotrofina-I, penicilina G, estreptomycinina y anfotericina y las células de músculo liso vascular de aorta en un medio similar pero suplementado sólo con 10% de suero fetal bovino.

De los clones resultantes se seleccionaron aquellos que mejor fenotipo presentaron de acuerdo con el tipo celular. De esta manera se obtuvieron las líneas celulares de cardiomiocitos **CM WT**, **CMIR *LoxP*** y de músculo liso vascular, **CMLV WT** y **CMLVIR *LoxP***.

2.4. OBTENCIÓN DE LÍNEAS CELULARES DE CARDIOMIOCITOS Y DE CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR CARENTES DEL IR (CMIR KO Y CMLVIR KO)

Las líneas celulares carentes del IR, denominadas **CMIR KO** y **CMLVIR KO** se obtuvieron a partir de las líneas celulares *LoxP* mediante la tecnología *LoxP/Cre*. Esta técnica está basada en la capacidad del enzima Cre recombinasa de reconocer y eliminar cualquier secuencia de ADN flanqueada por dos secuencias *LoxP*. Las líneas celulares IR

LoxP se caracterizaban por presentar el exón 4 del gen del IR flanqueado por secuencias LoxP. Mediante infecciones con adenovirus que expresaban CRE (AdenoCRE) se deletó el exón flanqueado, generándose un “codón de terminación temprano” que impidió la síntesis correcta del ARNm del IR, dando lugar a una proteína no funcional.

Las líneas celulares CMIR LoxP y CMLVIR LoxP se sembraron y crecieron en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino hasta que alcanzaron el 70-80% de confluencia. En ese momento, se procedió a la retirada de medio de cultivo y tras lavar las células con PBS, se infectaron con partículas virales AdenoCRE con un título de 10^9 pfu a una MOI (*multiplicity of infection*) de 10. Las células permanecieron en contacto con las partículas virales durante una hora agitando suavemente las placas cada quince minutos, para favorecer el contacto entre las células y las partículas virales. Transcurrida la hora de infección, se añadió a cada una de las placas un pequeño volumen de medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino. El volumen final de la placa no se completó hasta transcurridas siete-ocho horas de la infección, permaneciendo las células 48 horas más en contacto con las partículas virales. Finalmente, se obtuvieron varios clones de cada una de las líneas celulares, que se analizaron mediante Western blot para determinar la presencia o ausencia del IR.

Aquellos clones en los que se había obtenido éxito en la delección del IR, fueron de nuevo subclonados al menos en dos ocasiones más, con el fin de garantizar la total ausencia del IR. De todos aquellos clones generados se seleccionaron los que presentaron un mejor fenotipo.

2.5. OBTENCIÓN DE LÍNEAS CELULARES QUE EXPRESAN LAS ISOFORMAS A Y B DEL RECEPTOR DE INSULINA (IR_A E IR_B)

Las líneas **IR Rec A** e **IR Rec B**, que expresan de manera individual las isoformas A (-exón 11) y B (+exón 11) del IR, respectivamente, se generaron a partir de las líneas carentes del IR, CMIR KO y CMLVIR KO.

Las líneas IR KO se sembraron y crecieron en dos placas de cultivo cada una, en presencia de DMEM suplementado al 10% de suero fetal bovino hasta que alcanzaron el 70-80% de confluencia. En ese momento, se retiró el medio de cultivo y se lavaron las células con PBS. A continuación, se infectó una placa de cada línea con una de las construcciones retrovirales que codificaban para las isoformas humanas IR_A e IR_B del IR,

pBabe Hygro IR_A y pBabe Hygro IR_B, respectivamente, en presencia de polibreno (8µg/ml). Las células permanecieron 48 horas en contacto con los retrovirus, seleccionándose posteriormente con higromicina B como antibiótico de selección a una concentración de 200µg/ml durante 2 semanas.

Las construcciones retrovirales pBabe Hygro IR_A y pBabe Hygro IR_B fueron amablemente cedidas por CR Kahn (Joslin Diabetes Center, Harvard Medical School, Boston MA).

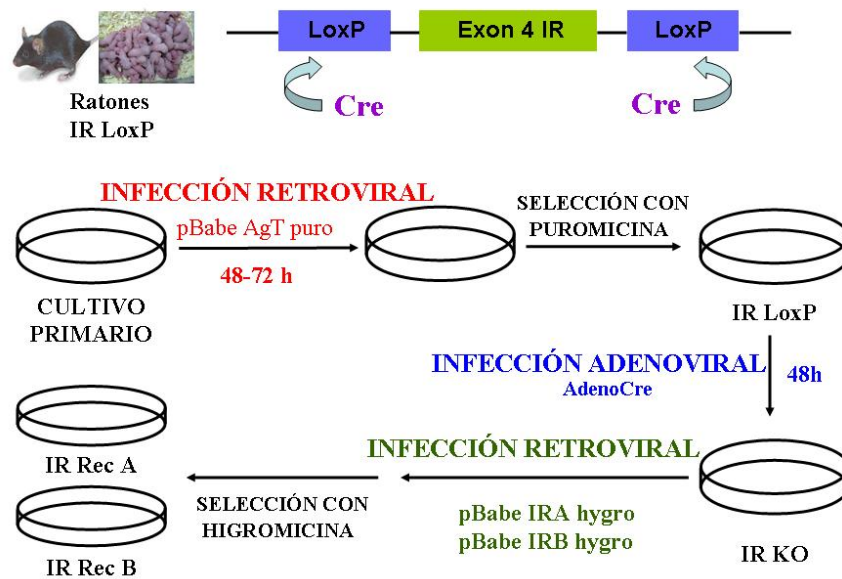


Figura 20. Esquema del proceso de inmortalización del cultivo primario, selección y generación de las líneas celulares IR LoxP IR KO y reconstituidas con las isoformas de IR.

2.6. CARACTERIZACIÓN DE LOS CULTIVOS PRIMARIOS Y DE LAS LÍNEAS CELULARES OBTENIDAS

La caracterización de los cultivos primarios se realizó en el caso de las CMLV. Se obtuvo el extracto de proteínas y se realizó un Western blot (ambos métodos explicados en el apartado 3.15) con el anticuerpo de la α -actina de músculo liso (α -SMC), proteína específica de este tipo de células.

A continuación se comprobó que todas las líneas se habían inmortalizado realmente, para ello se realizaron ambos Western blot frente al Antígeno T (así se comprueba la incorporación del plásmido) y frente a p53.

Para comprobar que las células aisladas eran realmente cardiomiocitos, se realizó un Western blot frente a la Troponina T, proteína específica del corazón.

Las líneas con delección del receptor de insulina y las líneas reconstituidas con las isoformas A o B del IR, se caracterizaron mediante un Western blot frente a la subunidad β de ese mismo receptor. Si el AdenoCRE había funcionado, esos clones no mostraban IR. Las líneas reconstituidas con las isoformas A o B, presentaron la banda correspondiente al IR. Para comprobar que estas líneas Rec A y Rec B sólo expresaban la isoforma A o B, se caracterizaron mediante RT-PCR semicuantitativa. Así se analizó la presencia o ausencia del exón 11 del IR, respectivamente.

Se sembraron y crecieron las células de ambas líneas en medio DMEM suplementado al 10% con suero fetal bovino hasta que alcanzaron la confluencia. A continuación se retiró el medio de cultivo, se lavaron con PBS y se obtuvo el ARN de cada una de las líneas celulares según el protocolo de extracción de ARN descrito a continuación.

Con el fin de eliminar las posibles contaminaciones de ADN que pudiesen interferir posteriormente en la reacción en cadena de la polimerasa, el ARN aislado se trató con ADNasa I.

A continuación se procedió a la síntesis del ADNc, utilizando el protocolo correspondiente a la transcriptasa inversa M-ML V RT (GibcoBRL). El ADNc se conservó a -20°C hasta el momento de su utilización.

Los *primers* utilizados en el análisis del exón 11 fueron:

<i>Primers</i>	Secuencia Sentido (S) Antisentido (AS)	Tm y nº ciclos
IR Ratón exón 11	(S) 5' ATCAGAGTGAGTATGACGACTCGG 3' (AS) 5' TCCTGACTTGTGGGCACAATGGTA 3'	60°C
IR Humano exón 11	(S) 5' ACCAGAGTGAGTATGAGGATTCGG 3' (AS) 5' TCCGGACTCGTGGGCACGCTGGTC 3'	30 ciclos

Tabla 4. *Primers* utilizados para la caracterización de las isoformas del IR.

El producto de la PCR se visualizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2,5% en el que se observaron dos fragmentos: un fragmento de 258pb, que contenía el exón 11; y un fragmento ligeramente más pequeño, de 222pb, exento de dicho exón, por lo tanto, se diferenciaban las dos isoformas del IR; IR_A (-exón 11) e IR_B (+exón 11).

2.7. CONGELACIÓN, DESCONGELACIÓN Y MANTENIMIENTO DE LAS LÍNEAS CELULARES

2.7.1. Congelación

La congelación de las células se realizó a partir de placas en confluencia lavadas con PBS y tratadas con tripsina 0,25% y EDTA 0,02% (Gibco®, Invitrogen). Una vez levantadas las células del plato, se añadió suero fetal bovino suplementado con 12% DMSO (dimetil sulfóxido) en el volumen adecuado para el tamaño del plato, y a continuación se guardaron en un vial de crioconservación. La congelación debe ser progresiva, por lo que en un principio los viales se mantuvieron a -20°C durante 2-3 horas, seguido de 15-24 horas a -80°C, para finalmente disminuir la temperatura hasta los -170°C en un tanque con nitrógeno líquido, hasta el momento de su utilización.

2.7.2. Descongelación

La descongelación ha de realizarse lo más rápidamente posible con el fin de garantizar la máxima viabilidad celular. Se extrajeron los viales del nitrógeno líquido y se colocaron directamente en un baño a 37°C. Una vez descongelados, se sembraron las células en placas con DMEM 10% suero fetal bovino y se guardaron en el incubador a 37°C, con atmósfera de 5% CO₂, 92-93% de aire y a una humedad relativa del 95%.

2.7.3. Mantenimiento

Para el mantenimiento de las líneas celulares, una vez alcanzada la confluencia celular, se procedió a la división mediante el uso de tripsina. La reacción se detuvo con DMEM 10% suero fetal bovino (SFB) y en el caso de los cardiomiocitos, este medio se suplementó con cardiotrofina-1 (0,2 ng/ml). Las células se resuspendieron homogéneamente y la suspensión celular se dividió en varias placas, poniendo la densidad celular adecuada según las necesidades de cada experimento.

3. TÉCNICAS EMPLEADAS EN LOS MODELOS *IN VIVO* E *IN VITRO*

3.1. CURVAS DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA

En todos los grupos de ratones se estudió la tolerancia a la glucosa, mediante una curva (GTT). Esta técnica sirve para determinar la rapidez de aclaramiento de la glucosa en sangre.

Para llevar a cabo este estudio, se realizó un ayuno de los ratones durante toda la noche, así se puede conocer su glucemia basal. A la mañana siguiente, se inyectó a los animales, de forma intraperitoneal, glucosa a razón de 2g/kg de peso corporal y se consideró ese momento como “tiempo cero”. Mediante una pequeña muestra de sangre tomada de la cola, se midió la glucosa a los minutos 0, 30, 60 y 120 después de la inyección de glucosa. Para ello se utilizó el sistema de tiras automático Accu-Chek® de Roche.

Si el animal es tolerante a la glucosa, a partir de los 30 minutos su glucemia debe disminuir paulatinamente hasta alcanzar aproximadamente los valores iniciales.

3.2. CURVA DE TOLERANCIA A LA INSULINA

Para estudiar la tolerancia a la acción de la insulina de los ratones, se llevó a cabo una curva de tolerancia a la insulina (ITT). Con esta técnica, podemos hacernos una idea de la capacidad de reacción del organismo a una dosis de insulina, midiendo la glucemia. Así, si después de la administración de la insulina, hay un descenso de la concentración de glucosa en sangre que se va recuperando a medida que avanza el experimento, se considera que el animal tiene una respuesta normal a la acción de dicha hormona.

La ITT se llevó a cabo en ratones sin ayunar, es decir, la concentración de glucosa en sangre inicial es postprandial. Se inyectó insulina humana (1U/kg de peso corporal, NovoNordisk) intraperitonealmente y se consideró a este momento, el tiempo cero. Se realizaron medidas de glucemia a los 0, 15, 30 y 60 minutos de haber realizado la inyección, utilizando el mismo sistema anteriormente citado. Los resultados se expresaron como porcentaje de concentración inicial de glucosa en sangre

3.3. TEST DE SECRECIÓN DE INSULINA

También se realizaron experimentos de secreción aguda de insulina. Estos estudios se realizan para comprobar la reacción inmediata del páncreas frente a una dosis de glucosa.

Para ello se ayunó a los ratones durante toda la noche y posteriormente se inyectó intraperitonealmente 3g/kg de peso corporal de glucosa.

Se tomaron muestras de sangre de la cola a los 0, 5 y 10 minutos desde la inyección de glucosa que se consideró como tiempo cero.

El contenido de insulina en plasma se determinó mediante ELISA utilizando un estándar de insulina murina (Cristal Chem).

3.4. SEÑALIZACIÓN *IN VIVO* DE LA INSULINA

Se realizaron estudios de señalización de la insulina *in vivo*. Para ello, se realizó una inyección intraperitoneal de una disolución de insulina de 1U/kg de peso corporal (NovoNordisk) en ratones sin ayunar. A los cinco minutos se procedió al sacrificio del animal y se extrajeron todos los tejidos necesarios.

Este tipo de estudios permiten conocer el estado de la ruta de señalización de la insulina en el animal, y comprobar su respuesta frente a un estímulo.

3.5. CÁLCULO DEL HOMA-IR

Se calculó el **HOMA-IR** que es un índice que mide la relación de resistencia a la acción de la insulina y se halla mediante el siguiente algoritmo matemático:

$$[\text{Glucosa (mg/dl)} \times 0,055] \times [\text{Insulina (mg/dl)} \times 24,25] / 22.5.$$

3.6. DETERMINACIÓN DEL PERFIL METABÓLICO

Las mediciones de insulina se realizaron en plasma de dos formas, una por radio-inmunoensayo (RIA), utilizando como estándar una insulina murina (Linco Research Co.). La otra forma de medir la insulina fue mediante ELISA (Millipore). En ambos casos se utilizó el plasma de los ratones ayunados 24 horas.

Las concentraciones de leptina, adiponectina y factor necrótico tumoral- α (TNF- α) se midieron en el plasma obtenido de los ratones al final del estudio, mediante kits de ELISA (Millipore y SABioSciences, respectivamente).

3.7. DETERMINACIÓN DEL PERFIL LIPÍDICO

En el plasma de los animales se midieron colesterol total, triglicéridos, glicerol y las fracciones LDL y HDL del colesterol. Para ello se utilizaron métodos colorimétricos de la casa Spinreact.

Las medidas del colesterol total y la fracción cLDL se basan en las reacciones:

Reacción	Enzima
Ésteres de colesterol \rightarrow Colesterol + Ácidos Grasos	<i>Colesterol Esterasa</i>
Colesterol + O ₂ \rightarrow 4-Colestenona + H ₂ O ₂	<i>Colesterol Oxidasa</i>
2H ₂ O ₂ + Fenol + 4-aminofenazona \rightarrow Quinonimina + 4H ₂ O	<i>Peroxidasa</i>

La quinonimina es un compuesto coloreado, la intensidad del color formado será proporcional a concentración de producto de la reacción y por tanto del lípido inicial en la muestra. Esta intensidad de color se valora a distintas absorbancias. En el caso del colesterol total se mide a 505nm, y en el del cLDL, es a 600nm.

La medida del cHDL se realiza utilizando un detergente que se adsorbe a la superficie de las lipoproteínas LDL, VLDL y quilomicrones, de forma que sólo se solubiliza el cHDL. Este cHDL liberado reacciona con los enzimas y cromógenos y aparece color.

La determinación de los triglicéridos se basa en las reacciones:

Reacción	Enzima
Triglicéridos + H ₂ O \rightarrow Glicerol + Ácidos Grasos Libres	<i>Lipoprotein Lipasa</i>
Glicerol + ATP \rightarrow Glicerol-3 fosfato + ADP	<i>Glicerol Quinasa</i>
Glicerol-3 fosfato + O ₂ \rightarrow DAP + H ₂ O ₂	<i>Glicerol fosfato oxidasa</i>
H ₂ O ₂ + 4-AF + p-Clorofenol \rightarrow Quinona + H ₂ O	<i>Peroxidasa</i>

La quinona es un compuesto coloreado, la intensidad de color se mide a 505nm. A mayor intensidad, más cantidad de triglicéridos presentes en la muestra.

3.8. REACTIVIDAD VASCULAR

La función vascular se estudió en anillos de la arteria aorta torácica al final del tratamiento en todos los animales.

El día del experimento, se aisló la aorta torácica, se limpió del tejido adyacente y se colocó en una solución de Krebs (118,5 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 2,8 mM CaCl₂, 1,1 mM KH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 11,1 mM glucosa) oxigenada (95% O₂ - 5%CO₂) a 4°C. Después, se procedió a cortar la aorta torácica en segmentos de aproximadamente 2mm de ancho.

Cada anillo se colocó en una copa con 5ml de tampón Krebs gaseado a 37°C y suspendido entre dos ganchos de acero con forma de L. El gancho superior se ancló a un transductor de fuerza (FT03, Grass) acoplado a un sistema computerizado (Mc Lab 8E, AD Instruments) para medir la tensión isométrica. Los anillos se equilibraron durante 60 ó 90 minutos hasta que dejó del fluctuar, cambiando el tampón cada 15 minutos, y con varios ajustes de longitud hasta estabilizar la tensión basal a 1g. En estudios previos, se encontró que 1g de tensión basal es la óptima para este tipo de experimentos.

Cuando la tensión fue estable, comenzaron los experimentos y lo primero que se hizo fue obtener la respuesta contráctil de referencia conseguida con 120 mM de KCl. Esto se debe a que el KCl activa los canales de potasio dependientes de voltaje de forma independiente.

La función endotelial se estudió evaluando las relajaciones dependientes de endotelio a la acción de la acetilcolina (ACh) en concentraciones crecientes desde 10⁻⁹ a 10⁻⁵ M y relajaciones independientes de endotelio inducidas por nitroprusiato de sodio en concentraciones crecientes desde 10⁻¹⁰ a 10⁻⁷M en anillos aórticos pre-contraídos con fenilefrina a una concentración de 10⁻⁶M.

Además se analizó la respuesta contráctil a angiotensina II a una concentración de 10⁻⁶ M y al análogo de tromboxano A₂ (U46619) en un rango de concentraciones desde 10⁻⁹ a 10⁻⁶M. Las contracciones se expresaron como porcentaje respecto a la concentración máxima alcanzada por el KCl.

3.9. INMUNOHISTOQUIMICA

Para el análisis histológico se emplearon dos técnicas, en función del material en que estaban incluidos los tejidos.

Algunos tejidos (arco aórtico, corazón y músculo esquelético) se incluyeron en OCT (Tissue-tek) y se realizaron cortes de 7µm de grosor, en un criostato a -20°C. Estos cortes se trataron con acetona durante 10 minutos, para que tuviera lugar la fijación del tejido. A continuación se realizó un tratamiento con metanol:H₂O₂ (3%) para inactivar la actividad peroxidasa endógena y después se realizaron lavados con PBS. Posteriormente se realizó un bloqueo con una solución de PBS con 4% de BSA y 6% de suero del huésped del anticuerpo secundario durante una hora a temperatura ambiente.

Para valorar la infiltración de macrófagos, la expresión de PAI-1 y la cantidad de nitrotirosina, se utilizaron un anticuerpo de rata anti- F4/80 de ratón (MCA497GA, AbD Serotec), un anticuerpo policlonal de conejo anti-PAI-1 (Santa Cruz, ver tabla X+3) y un anticuerpo policlonal de conejo anti-nitrotirosina (Upstate #06-284) respectivamente. Se realizó una incubación durante toda la noche con cada anticuerpo primario, posteriormente se realizó un lavado con PBS y finalmente se incubaron las muestras durante una hora, con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa.

Las secciones se tiñeron con 3,3 L- tetrahidrocloruro de diaminobenzidina (DAB, Dako Denmark) durante diez minutos a temperatura ambiente. A continuación se realizó una tinción de contraste con hematoxilina y se montaron con medio IBIDI. En cada experimento, se realizaron controles negativos sin el anticuerpo primario o usando un anticuerpo no relacionado, para comprobar la tinción no específica.

Otros estudios histoquímicos se realizaron en páncreas incluidos en parafina, que se cortaron en secciones de 5µm de grosor a intervalos de 5mm. Para poder estudiar el tejido, se eliminó la parafina y se hidrataron los cortes con una batería de alcoholes en graduación decreciente. Se incubaron durante media hora con metanol:H₂O₂ (3%), se lavaron con PBS y se realizó un tratamiento con citrato durante 30 minutos para que tuviera lugar la digestión del tejido y así facilitar la unión del anticuerpo al epítipo diana. A continuación se bloquearon con la misma solución de bloqueo anteriormente descrita y se incubaron durante toda la noche a 4°C, con un anticuerpo primario (anti-insulina (DAKO) o UCP-2(Santa cruz Biotech.). A la mañana

siguiente, se incubaron con un anticuerpo secundario durante una hora a temperatura ambiente.

La detección de las células β se realizó con tinción ABC peroxidasa, ya que el anticuerpo secundario estaba conjugado con biotina. Como cromógeno se utilizó DAB y hematoxilina para contrastar y teñir los núcleos de las células. El contenido de insulina o la expresión de UCP-2 en el páncreas, se midió como tinción positiva por área de islote.

También se realizó una tinción hematoxilina/eosina del tejido pancreático, para relacionar el tamaño de islote con la cantidad de célula β presente en el mismo.

3.10. INMUNOFLUORESCENCIA

Esta técnica se utilizó en páncreas incluidos en parafina, cortado en secciones de 5 μ m de grosor.

Se desparafinó y se hidrató el tejido. Se realizó el tratamiento con citrato y el bloqueo con una solución de PBS con 4% de BSA y 6% de suero del huésped del anticuerpo secundario durante una hora. A continuación, se incubó durante toda la noche con el anticuerpo primario (anti- Insulina o anti-UCP-2) a 4°C. A la mañana siguiente se procedió a una incubación con el anticuerpo secundario, que en este caso lleva un fluoróforo conjugado (Texas-red anti-guinea-pig (706-076-148 Jackson Immunoresearch) para insulina y CyTM2 anti-goat (705-226-147 Jackson Immunoresearch) para UCP-2) de manera que al excitarlo con una determinada longitud de onda, emite fluorescencia. A continuación se realizó una serie de lavados con PBS y se incubó durante 5 minutos con DAPI (tinción para núcleos) y finalmente se montaron con glicerol.

3.11. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

La lesión del arco aórtico se midió en cortes histológicos teñidos con hematoxilina, como se describe en Lopez-Franco y col., 2006. Después del análisis de imagen, el área individual de la lesión fue determinada mediante la realización de una media de los valores máximos de tres-cuatro secciones.

3.12. DETERMINACIÓN DE LA ACUMULACIÓN LIPÍDICA EN TEJIDOS

Los cortes de arco aórtico, corazón, músculo esquelético e hígado, procedentes de tejidos incluidos en OCT, se tiñeron con Oil-Red-O y se contrastaron con hematoxilina, para visualizar los depósitos de lípidos.

3.13. DETERMINACIÓN DEL ANIÓN SUPERÓXIDO EN LA ARTERIA AORTA

Para determinar la concentración de anión superóxido *in situ*, se utilizó Hidroetidina (HE), que es un colorante oxidativo fluorescente. Las células son permeables a la HE, y en presencia de anión superóxido, la HE se oxida a bromuro de etidio fluorescente, de tal manera que queda retenido en las células debido a su capacidad intercalante en el DNA. Este método proporciona una detección muy sensible al anión superóxido en el propio tejido.

Para llevar a cabo esta técnica, se utilizaron secciones aórticas de 25 μ m de grosor, colocadas sobre un porta de cristal. Se aplicó HE a concentración 2x10⁻⁶M en cada sección. Se cubrieron y se incubaron en una cámara oscura humidificada, a 37°C durante 30min. A continuación, se observaron con microscopio confocal (excitación a 480nm y emisión a 610nm) y se realizaron microfotografías. En ellas se pudo observar la intensidad y localización de la HE oxidada. Esto refleja la producción de anión superóxido.

La formación de anión superóxido también se midió por quimioluminiscencia con lucigenina, en anillos aórticos de los ratones. Se extrajo la arteria aorta torácica el mismo día del experimento, se eliminó todo aquel tejido que no perteneciera al vaso, y se introdujo la aorta en solución Krebs a 4°C. A continuación se cortó el vaso en segmentos de 2-3mm de longitud. Cada anillo se estabilizó con una solución de Hepes a 37°C. Las medidas se realizaron en el luminómetro cada 30 segundos durante 5 minutos.

Una vez estabilizadas, se procedió a la valoración del Hepes+Lucigenina (25mM) como control. A continuación, se añadió el anillo aórtico y se procedió a la valoración de la correspondiente producción de anión superóxido. Finalmente, se añadió Tyron (10mM) que es un quelante o agente neutralizante del anión superóxido. La producción de anión superóxido se expresó como U/min/mg de anillo aórtico.

Finalmente, realizamos una medida indirecta de los aniones superóxido. En presencia de estos aniones, el óxido nítrico puede generar peroxinitrito, que es un potente agente oxidante y nitrante de las especies reactivas de nitrógeno (RNS). Estas RNS, pueden provocar la oxidación y nitración de la tirosina. Por lo tanto, mediante inmunohistoquímica (ver apartado 3.9.), medimos las concentraciones de nitrotirosina en secciones aórticas y como consecuencia, la formación de anión superóxido.

3.14. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GENES POR PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL

La PCR cuantitativa a tiempo real permite conocer el número de copias de un determinado gen de interés, normalizado por un gen endógeno de expresión constitutiva. Utilizando esta técnica, se analizó la expresión de distintos genes.

Esta técnica emplea una serie de *primers* específicos para el gen de interés y una sonda *Taqman MGB probe* también específica. La RT-PCR cuantitativa a tiempo real aprovecha la capacidad 5'-3' exonucleasa de la ADN polimerasa. Esto permite que el extremo 3' amortigüe la fluorescencia procedente del *primer* mientras que la sonda permanece inalterada. Sin embargo, a medida que la ADN polimerasa va sintetizando la hebra complementaria, rompe la sonda, libera el extremo 5' y emite fluorescencia (Figura 21).

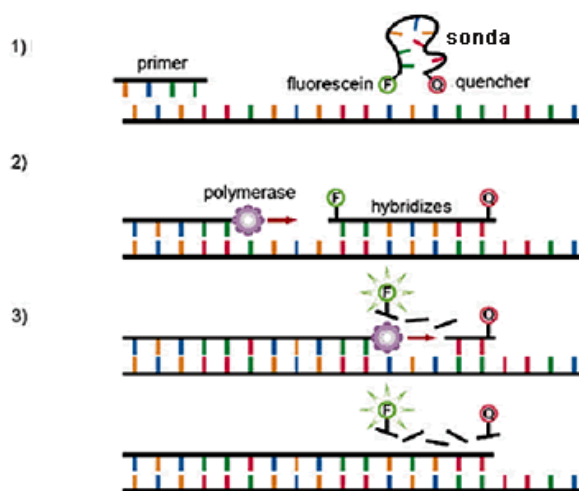


Figura 21. Esquema de la generación de fluorescencia en la PCR cuantitativa a tiempo real por el desplazamiento de la ADN polimerasa. 1) Desnaturalización; 2) Alineación del *primer* e hibridación de la sonda; 3) Desplazamiento de la hebra y fragmentación de la sonda. (Esquema procedente de Applied Biosystems)

Las sondas pueden ser de diferentes tipos según la capacidad de unión a su secuencia específica. En nuestro caso se usaron sondas m, las cuales se caracterizan porque se unen a uniones exón-exón, y así permiten discriminar posibles contaminaciones de ADN genómico. Para realizar la reacción se utilizó el tampón *TaqMan Universal PCR Master Mix (2x)*, que incluye *AmpliTaq Gold® DNA Polymerase*.

Respecto al resto de la técnica, consiste en la síntesis exponencial de copias de un tamaño de entre 100pb y 600pb a partir de una molécula mayor de ADN de doble cadena, que en nuestro caso es un ADNc sintetizado por retrotranscripción a partir de ARN.

La PCR cuantitativa a tiempo real, se analiza en la zona en que la reacción se convierte en lineal. Así, el programa informático que analiza la emisión de fluorescencia de cada muestra (*Prism7000 System SDS software* de Applied Biosystems), coloca el nivel de detección o umbral en dicha zona, que suele coincidir con la parte baja de la curva en las representaciones exponenciales. El punto de corte del umbral con la curva se conoce como Ct y hace referencia al ciclo de amplificación de la muestra (Figura 22)

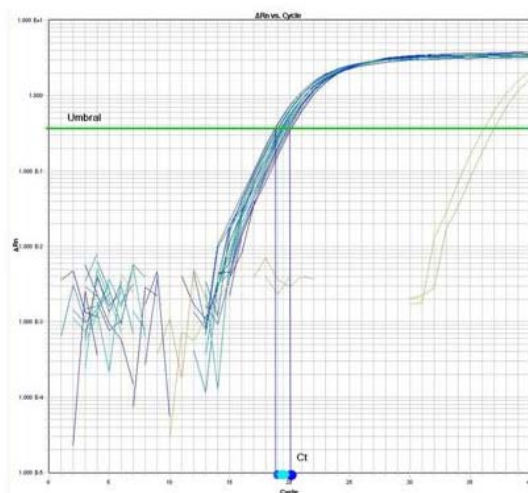


Figura 22. Representación de curva logarítmica de detección de fluorescencia de una PCR cuantitativa a tiempo real.

3.14.1. Extracción del ARN y obtención del ADNc

Antes de realizar la PCR cuantitativa a tiempo real, hubo que aislar el ARN de los tejidos, para lo que se utilizó el método de TRIzol® de Invitrogen. Después se cuantificó dicho ARN midiendo su absorbancia a 260nm, por duplicado.

Se utilizaron 20ng de ARN para la reacción de transcripción reversa que se llevó a cabo durante 15 min a 25°C y 2 horas a 37°C, con el kit “High Capacity Archive kit” de Applied Biosystems y así se obtuvo el ADNc.

Se estudió la expresión de los siguientes genes:

Tejido o células	Genes estudiados
Arteria aorta	<i>eNOS, iNOS, ICAM-1, ET-1, MCP-1, TNF-α, TNFR1, TNFR2, PAI-1, NOX-4, SOD-2, Catalasa, Gpx1, Gpx4 y UCP-2</i>
Corazón e hígado	<i>UCP-2</i>
Músculo esquelético	<i>UCP-2, UCP-3</i>
BAT	<i>UCP-1, TNFα, Leptina, Adiponectina, PAI-1</i>
WAT	<i>TNFα, Leptina, Adiponectina, PAI-1</i>
Cardiomiocitos	<i>UCP-2, PGC-1α, Glut-4</i>
CMLV	<i>UCP-2</i>

Tabla 5. Genes estudiados por RT-qPCR.

Como control interno de todas las muestras, se usó el enzima gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) o la fracción 18s, en cada una de las reacciones.

3.14.2. PCR cuantitativa a tiempo real

Los datos de luminiscencia de cada una de las muestras para cada gen, es lo que se denominó Ct. En nuestro caso, cada muestra se estudió por duplicado, por lo que se hizo una media aritmética de los Ct. A continuación se calculó el incremento de cada muestra, llamado Δ Ct, que viene dado por la diferencia del Ct del gen correspondiente y el Ct del normalizador (*GAPDH*).

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct}(\text{gen1}) - \text{Ct}(\text{GAPDH})$$

A su vez, al Δ Ct de cada muestra se le restó el Δ Ct de la muestra control y este valor se denominó $\Delta\Delta$ Ct y a su potencia negativa de base 2, Rq.

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ de cada muestra - ΔCt del control

$$Rq = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

El dato de Rq se calcula como ayuda visual para entender el resultado, pero no constituye una escala lineal.

La interpretación de los resultados en función del Rq es:

- $Rq < 0,5$ **Descenso de expresión**, existe menos del 50% de número de copias que en la muestra considerada control.
- $0,5 < Rq < 2$ **Expresión normal**, ya que está comprendido en un intervalo de $\pm 50\%$ de lo considerado normal, es decir, de la unidad.
- $Rq > 2$ **Aumento de expresión**, ya que son niveles superiores al 50% de la expresión normal.

3.15. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS MEDIANTE WESTERN BLOT

3.15.1. Obtención de extractos de proteínas

Los extractos de proteínas totales se obtuvieron a partir de placas de cultivo en las que las células se encontraban en confluencia. Las placas de cultivo se lavaron dos veces con PBS frío y posteriormente se lisaron a 4°C (sobre hielo) en 100 - 500 μ l de tampón de lisis (EDTA 5mM, NaCl 50 mM, pirofosfato sódico 30 mM, NaF 50 mM, Na_3VO_4 100 μ M, Tritón X-100 1%, Tris pH 7,6 10 mM, PMSF 1mM, aprotinina 1 mM, leupeptina 1 mM)

Las células se levantaron de la placa mediante raspado y el lisado se colocó en tubos de 1,5 ml. Los lisados se centrifugaron a 13.000 rpm durante cinco minutos, a continuación se transfirieron los sobrenadantes (fracción donde se encuentran las proteínas) a tubos nuevos para su uso inmediato o congelación a -80°C.

3.15.2. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de las proteínas obtenidas, se realizó mediante el ensayo descrito por Bradford [Bradford 1976]. Para ello se usó el agente "*Bio-Rad protein assay*" (Bio-Rad) y albúmina de suero bovino (Bio-Rad protein Assay standard H, Bio-Rad) para preparar una curva patrón de concentraciones crecientes. La cuantificación se realizó mediante la adición de 1ml de dilución de reactivo de Bradford (en una proporción 1:4) a 1-2 μ l de

muestra. La lectura espectrofotométrica de la reacción se realizó a una longitud de onda de 595 nm.

3.15.3. Electroforesis de proteínas

Una vez valorados los extractos proteicos, se prepararon las muestras de forma que todas contuvieran la misma cantidad de proteínas, alrededor de 20-60 μg , y se mezclaron en proporción 4:1 con un tampón compuesto por: Tris 72 mM pH 7,6, glicerol 10% (v/v), SDS 1% (p/v), azul de bromofenol 0,002% (p/v), y β -mercaptoetanol 2 mM.

Estas muestras se calentaron a 95°C durante cinco minutos y se cargaron en un gel de poliacrilamida-SDS. En un carril del mismo gel se cargó un patrón de pesos moleculares, con una mezcla de proteínas de tamaños conocidos (*Prestained SDS-PAGE Standards* Bio Rad).

La electroforesis se realizó según el método descrito por Sambrook y Gething 1989. Los geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) para electroforesis estaban formados por un gel concentrador y un gel separador. El porcentaje de acrilamida del gel separador varió en función de las necesidades de cada experimento.

3.15.4. Transferencia de proteínas

Una vez separadas suficientemente las proteínas mediante la electroforesis se procedió a la transferencia de las mismas a una membrana de polivinildifluoruro o PVDF (*Immobilon-P*®) mediante el paso de corriente eléctrica.

La transferencia de proteínas se realizó por dos métodos diferentes: transferencia semi-seca (apropiada para proteínas de bajo peso molecular) y transferencia húmeda (para la transferencia de proteínas de alto peso molecular).

3.15.5. Inmunodetección de las proteínas

Finalizada la transferencia, se realizó el bloqueo o saturación de todos los sitios inespecíficos de unión de proteínas en la membrana de PVDF. Para ello, la membrana fue incubada durante una hora con agitación suave en solución de bloqueo, preparada con TBS (NaCl 150 mM, Tris 10 mM pH 7,3) suplementado con leche en polvo desnatada al 5% (p/v) en todos los casos excepto en el caso de Antígeno T, Troponina T y Tubulina en los que se utilizó albúmina sérica bovina (BSA) al 3% (p/v).

Posteriormente, se eliminó este tampón y se añadió el anticuerpo primario correspondiente diluido en TTBS (TBS con 0,05% de Tween-20), incubándose con agitación suave a 4°C durante toda la noche. Tras esta incubación se realizaron cuatro lavados sucesivos de diez minutos cada uno con el tampón de lavado TTBS. A continuación se añadió el anticuerpo secundario (un anticuerpo de cabra dirigido contra las inmunoglobulinas de ratón, conejo o cabra, conjugado con una peroxidasa de rábano) y con él se incubó la membrana de PVDF durante al menos una hora a 4°C.

Finalmente se realizaron otros 4 lavados con TTBS y se procedió al revelado, consistente en la detección de la peroxidasa fijada mediante una técnica quimioluminiscente, utilizando el equipo de detección comercializado por Amersham (ECL) y películas fotográficas de alta sensibilidad de la misma casa.

La cuantificación de bandas se realiza mediante un escáner densitométrico, utilizando el sistema de análisis de imagen Image J.

Anticuerpo	Laboratorio (Referencia)
Anticuerpos utilizados en la caracterización de líneas celulares	
β -actina	Sigma A-5441
α -SMA	Sigma A-2547
Antígeno T	Santa Cruz Sc-25326
Glut-1	Chemicon CBL 242
Glut-4	Chemicon AB1346
Receptor insulina (cadena β)	Santa Cruz Sc-711
Troponina T	Abcam Ab10214-200
Tubulina	Sigma T-5168
Anticuerpos utilizados en el estudio de la Señalización y el Metabolismo Energético	
Acetil- CoA carboxilasa	Cell Signaling #3662
Akt	Cell Signaling #9272
AMP quinasa	Cell Signaling #2532
ERK 1/2	Cell Signaling #9102
Fosfo- Acetil-CoA carboxilasa Ser 79	Cell Signaling #3661
Fosfo- Akt Ser 473	Cell Signaling #9271
Fosfo- AMP quinasa Thr 172	Cell Signaling #2531

Anticuerpo	Laboratorio (Referencia)
Fosfo- ERK 1/2	Cell Signaling #9101
Fosfo- p70 Thr389	Cell Signaling #9204
Fosfo- PKC ξ/λ	Cell Signaling #9378
IRS-1	Upstate Biotechn 06-248
IRS-2	Upstate Biotech 06-506
p70	Cell Signaling #9202
Anticuerpos utilizados en el estudio de la Inflamación	
Adiponectina	Abcam ab3455
Fosfo-NOS3 Ser 1177	Santa Cruz Sc-4107
Leptina	Abcam ab3583
NOS-2 (iNOS)	Santa Cruz Sc-651
NOS3 (eNOS)	Santa Cruz Sc-654
PAI-1	Santa Cruz Sc-8979
TNF- α	Abcam ab3467
UCP-1	Santa Cruz Sc-6529
UCP-2	Santa Cruz Sc-6525

Tabla 6. Lista de anticuerpos primarios utilizados.

3.16. INMUNOPRECIPITACIONES

Esta técnica tiene como finalidad la separación de una proteína específica de un extracto de proteínas totales. Una vez realizada la separación, se detecta la interacción de la misma con otras proteínas presentes en la célula.

Se prepararon alícuotas de extractos de proteína total de (500-1000 μ g), obtenidos y valorados según el método Bradford descrito anteriormente. A cada muestra se le añadió 1 μ g del anticuerpo correspondiente y se incubaron en rotación a 4°C durante toda la noche. Transcurrido este tiempo se adicionaron 20 μ l de proteína A o proteína G (según el anticuerpo primario usado) unidas a agarosa (suspensión 50/50 en tampón de lisis) y se prolongó la incubación en las mismas condiciones durante 2-4 horas para que las esferas de agarosa adsorbiesen los inmunocomplejos formados y permitir así su separación de la

fracción líquida. Por último, se procedió a su lavado con tampón de lisis. Los inmunoprecipitados adsorbidos en las esferas se utilizaron para el análisis de la interacción con otras proteínas mediante Western blot. Se añadió el tampón de carga y se calentaron las muestras durante cinco minutos a 95°C para separar los complejos de la agarosa, quedando preparadas para ser analizadas en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

3.17. OBTENCIÓN DE ADN PLASMÍDICO PARA TRANSFECCIÓN

3.17.1. Transformación de bacterias competentes

Todo el material utilizado durante este proceso se esterilizó antes de su uso.

Para realizar la transformación se usaron bacterias *Escherichia coli* competentes (*Epicurean Coli® Ultracompetent Cells*) de los laboratorios Stratagene. Tras descongelar en hielo 50µl de bacterias, se les añadió 2,5µl de β-mercaptoetanol y se dejaron en hielo 10 minutos, agitando periódicamente a intervalos de dos minutos. Transcurrido ese tiempo se añadieron 50-100 ng del plásmido de interés y se mantuvieron nuevamente en hielo durante 30 minutos. A continuación, se calentaron los tubos en un baño a 42°C durante 30 segundos y posteriormente se mantuvieron en hielo 5 minutos. Tras someterlos a este proceso se añadió a cada tubo un ml de medio LB (10g Bacto-triptona, 10 g NaCl y 5 g de extracto de levadura por litro, pH 7, esterilizado en autoclave) y se incubaron a 37°C durante 45 minutos. De esta manera se permitió que las bacterias desarrollasen la resistencia al antibiótico correspondiente. Una vez transformadas, se procedió a la selección de las bacterias que habían incorporado el ADN mediante la siembra en placas petri con LB-Agar (medio LB al 1,5% de agar) suplementado con el antibiótico correspondiente en función de la resistencia que confiriese el plásmido (ampicilina 100µg/ml). Las bacterias se dejaron crecer durante toda la noche a 37°C.

El material de desecho generado fue tratado con lejía y esterilizado en autoclave.

3.17.2. Crecimiento bacteriano, extracción del ADN plasmídico y purificación del ADNc

Para la obtención del ADN plasmídico a partir de los *stocks* conservados en glicerol o de las colonias de cepas bacterianas, se procedió al crecimiento de dichas bacterias en

medio LB. En primer lugar, se realizó un preinóculo a partir del *stock* o de la colonia, en tubos de 50 ml estériles que contenían 3 ml de medio LB suplementado con el antibiótico adecuado, ampicilina (100 µg/ml), manteniéndose toda la noche en una estufa a 37°C, con agitación orbital. A la mañana siguiente, si se produjo crecimiento bacteriano, se trasladó el contenido de cada tubo a un matraz de 500 ml con 50 ml de medio LB suplementado de igual forma con antibióticos y se dejó crecer durante unas horas en las mismas condiciones anteriores. Una vez obtenido un crecimiento bacteriano adecuado, se procedió a la recogida de nuevos *glicerol-stock* (800µl de solución de bacterias-LB y 200µl de glicerol estéril que se almacenaron a -80°C) y se transfirió el resto del contenido de cada matraz a otro de 2 litros que contenía 500 ml de medio LB suplementado con el antibiótico y se dejó crecer hasta el día siguiente en las condiciones habituales, obteniendo una D.O. de 0,6 a 600 nm. El contenido del matraz se vertió en tubos de centrifuga de 200ml de capacidad previamente lavados y esterilizados. Las bacterias se centrifugaron entonces a 6000xg durante 10 minutos a 4°C. El precipitado obtenido se sometió a una lisis alcalina para extraer ADN plasmídico, siguiendo el protocolo indicado en el kit *QIAGEN Plasmid Kits* de los laboratorios Qiagen. El ADN plasmídico así obtenido se conservó a -20°C, resuspendido en tampón TE (1 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 8), estando ya listo para su utilización en transfecciones, previa cuantificación.

Todo el proceso de crecimiento de las bacterias se realizó al mechero Bunsen, y el material sólido y líquido de desecho se trató con lejía y se autoclavó para su esterilización.

Una vez aislado el ADN plasmídico, se digirió con los enzimas de restricción apropiados para obtener el inserto de interés. La reacción se llevó a cabo durante dos- tres horas usando el tampón de digestión más adecuado para el enzima o enzimas utilizados. Para comprobar si la digestión había sido completa, se tomaron alícuotas de las muestras digeridas, y se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1,2 % utilizando como tampón TAE (Tris 40 mM, ácido acético glacial 20 mM y EDTA 1 mM, pH 8). Asimismo, para comprobar el tamaño del inserto, en el gel también se cargó una cantidad conocida de algún marcador de pesos moleculares (el cromosoma del fago λ digerido con el enzima Hind III o bien el ADN del fago φX174 RF digerido con el enzima Hae III, si el fragmento tiene un tamaño muy pequeño).

Las muestras de ADN y el marcador de peso molecular se prepararon añadiendo tampón de carga 6x: glicerol 30 % (v/v), azul de bromofenol 0,25% (p/v), xileno cianol 0,25% y 1 µl de bromuro de etidio (1mg/ml). Se realizó una electroforesis y después, se

expuso el gel a la luz ultravioleta para visualizar y fotografiar los distintos fragmentos de ADN gracias al bromuro de etidio.

Si la digestión era satisfactoria, se procedía a purificar el inserto de ADNc. Para ello, el ADN plasmídico digerido se sometió a electroforesis. Una vez que las bandas correspondientes al plásmido y al inserto de ADNc estuvieron suficientemente separadas, se cortó lo más finamente posible el fragmento de agarosa que contenía el inserto, introduciéndolo en un tubo de 1,5 ml. El ADN del inserto se extrajo de la agarosa siguiendo el protocolo del kit "*QIA quick Extraction*" de los laboratorios Qiagen, obteniendo finalmente el inserto en suspensión acuosa. La cuantificación se realizó de dos formas distintas: en primer lugar se realizó una valoración espectrofotométrica y en segundo lugar, se realizó una electroforesis con dos alícuotas de distinta concentración de la muestra obtenida y una cantidad conocida de un patrón de tamaño de bandas (*DNA ladder*), de modo que comparando la banda del inserto con las del patrón se obtuvo una valoración aproximada de la concentración de la solución. El inserto ya purificado se conservó a -20°C.

3.18. INFECCIONES RETROVIRALES

Las infecciones retrovirales se utilizaron para la introducción de genes de interés en las células, obteniendo mediante selección con antibióticos, líneas celulares que expresen de forma permanente el gen. Las construcciones usadas para la realización de este estudio han sido:

- el vector retroviral pBabe/puromicina con la secuencia del antígeno T del virus del polisoma SV40 (cedido generosamente por el Dr. J de Caprio, Dana Farber Cancer Institute, Boston, EEUU).
- los vectores retrovirales pBabe hygro con las secuencias de las isoformas IR_A e IR_B del IR (cedidas generosamente por CR Kahn, Joslin Diabetes Centre, Boston).

3.18.1. Obtención de los retrovirus

La construcción retroviral debe ser transfectada a una célula denominada "empaquetadora" que dotará a la partícula viral de una envuelta que le permita infectar las células diana. Para ello, se realizó una transfección por el método de permeabilización

con fosfato cálcico, de acuerdo con el protocolo del kit de transfección para células de mamífero de los laboratorios *Stratagene* (ref. #200388), usando la línea celular de células empaquetadoras Phoenix.

3.18.1.1. Preparación de la suspensión de ADN plasmídico

La cantidad de ADN plasmídico que se transfectó fue de 3µg por placa de cultivo de 6 cm de diámetro. Por un lado, se preparó la cantidad necesaria de ADN completando hasta un volumen final de 225 µl con agua estéril, y se añadieron 25 µl de la Solución 1 (CaCl₂ 2,5 M). Por otro, se prepararon 250 µl de Solución 2 (BBS pH 6,95: ácido N,N-bis (2-hidroxiethyl)-2-aminoetanosulfónico 50 mM, NaCl 280 mM, Na₂HPO₄ 1,5 mM). A continuación, sobre la Solución 2 se añadió, gota a gota, la suspensión de ADN, mientras se gaseó lentamente con nitrógeno. La mezcla se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. El gaseo con el nitrógeno favorece la formación del precipitado de Ca₃(PO₄)₂, lo que facilita la transfección al mejorar la adsorción del ADN a la membrana celular, e impide la digestión del ADN por desoxirribonucleasas.

3.18.1. 2. Preparación de las células

A las placas de cultivo de 6 cm de diámetro y a un 60-80% de confluencia, se les retiró el medio normal de cultivo, y se lavaron dos veces con PBS. Seguidamente, a cada placa se le añadieron 4,5 ml de medio DMEM suplementado con 5% de suero bovino modificado, MBS. De esta manera, las células estaban listas para recibir el ADN.

3.18.1.3. Incubación de las células con el ADN plasmídico

Una vez transcurridos los 30 minutos de incubación de la suspensión del ADN, se añadieron 500µl a cada placa de cultivo y se colocaron en el incubador.

Transcurridas entre 4 y 6 horas desde la transfección, se lavaron las placas con PBS1X y 15% de glicerol y se añadió DMEM suplementado con 10% de suero. Al día siguiente de la transfección se retiró el medio a las células y se repuso con 3ml de medio nuevo. Otras 24 horas después, se recogió el medio que contenía las partículas virales con el ADN de interés, secretadas por las células Phoenix. Este medio se filtró para eliminar posibles restos celulares y a continuación esta suspensión viral se congeló y se conservó a -80°C hasta el momento de su utilización.

3.18.2. Infección celular

A las placas de cultivo de 6 cm de diámetro y a un 70-80% de confluencia, se les retiró el medio de cultivo y se lavaron con PBS. Seguidamente, a cada placa se le añadió la solución que contenía los virus y 8µg/ml de polibreno y se incubaron a 37°C durante 4 horas. Transcurrido este tiempo se añadió medio sin retirar los virus y estas condiciones se mantuvieron durante 48-72 horas.

3.18.3. Selección celular

Para seleccionar las células que incorporaron la construcción retroviral, transcurridas 48-72 horas de la infección, a las células se les retiró el medio que contenía los virus y éste fue sustituido por DMEM suplementado con 20% de suero fetal bovino y el antibiótico de selección al que confería resistencia la construcción usada:

- Puromicina 250 µg/ml (Gibco Inc., Gaithersbury, Md)
- Higromicina, 200 µg/ml (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO)

Este medio se cambió periódicamente manteniendo las células con el antibiótico hasta completar la selección, por un tiempo nunca inferior a dos semanas.

3.19. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresan como media \pm error estándar.

La comparación se realiza por un análisis de la varianza o test ANOVA y por el test de comparación múltiple Bonferroni, si se han observado diferencias. Se realizaron distintas correlaciones de la expresión de genes en los modelos animales, utilizándose en todos los casos, el coeficiente de correlación de Spearman.

Como valor de discriminación de diferencias estadísticamente significativas, se utiliza $p \leq 0,05$. Los datos se analizaron con el paquete informático SPSS v.15.0.

Resultados

1. PAPEL DE LOS MECANISMOS COMPENSATORIOS FRENTE A LA RESISTENCIA A LA INSULINA EN EL DAÑO VASCULAR GENERADO EN EL RATÓN BATIRKO OBESO

1.1. CARACTERIZACIÓN DEL MODELO BATIRKO SOMETIDO A DIETA GRASA (HFD)

En primer lugar, confirmamos que la delección del receptor de la insulina específicamente en el tejido adiposo marrón generaba una lipoatrofia marrón severa, caracterizada por una pérdida de la masa del tejido adiposo marrón interescapular. Así, observamos que el ratio de la masa del tejido adiposo marrón respecto al peso corporal [BAT (mg)/P (g)] en todos los ratones BATIRKO, independientemente de la dieta administrada, fue significativamente menor que el ratio obtenido para los dos grupos de controles (Tabla 7). Además, se ha visto en otros modelos experimentales y en estudios en adultos humanos, que la pérdida de masa del tejido adiposo marrón puede conferir susceptibilidad a la obesidad. En nuestro modelo experimental, no observamos cambios significativos en el peso corporal debido a que el momento en que se separaron los grupos para la administración de la dieta estándar o grasa, fue a las 17 semanas de edad, cuando los animales BATIRKO ya habían desarrollado su fenotipo y cuando todos los ratones tenían un peso estable, ya que eran adultos jóvenes. Sin embargo, medimos un parámetro de obesidad como es el ratio de la masa del tejido adiposo blanco visceral respecto al peso corporal [WAT (mg)/P (g)], y observamos que los animales alimentados con dieta estándar (STD) no mostraban obesidad, al igual que los controles alimentados con dieta grasa (HFD). Por el contrario, el ratón BATIRKO sometido a dieta grasa mostró un aumento estadísticamente significativo de dicho ratio comparado con el de los otros grupos. Por tanto, se puede deducir que estos animales BATIRKO sometidos a dieta grasa desarrollaban obesidad (Tabla 7).

	Control STD	BATIRKO STD	Control HFD	BATIRKO HFD H	BATIRKO HFD N
Peso corporal (g)	28.9 ± 0.7	27.9 ± 1	27.8 ± 1	29.9 ± 0.3	31.4 ± 0.7
WAT (mg)/P(g)	15.5 ± 1.5	21.0 ± 3.5	22.4 ± 3.6	45.5 ± 5.9 *†	41.1 ± 3.9*††
BAT (mg)/P(g)	2.39 ± 0.2	0.86 ± 0.07*	1.9 ± 0.15	0.8 ± 0.08*††	0.6 ± 0.04*††§
Insulina (ng/mL)	0.37 ± 0.08	0.18 ± 0.02	0.3 ± 0.1	1.4 ± 0.2 *†	0.42 ± 0.05††§
Glucosa (mg/dL)	120.7 ± 5.9	125.4 ± 7.8	117 ± 9	122.8 ± 15	138 ± 9* ‡
HOMA-IR	33.7 ± 12.8	14.4 ± 2.2	21.12 ± 11.5	128 ± 33 *†	38.5 ± 8.3*†

Tabla 7. Caracterización metabólica del modelo BATIRKO obeso. *p<0.05 vs. Control STD; †p<0.05 vs. BATIRKO STD; ‡p<0.05 vs. Control HFD; §p<0.05 vs. BATIRKO HFD H.

Cuando se generó este modelo experimental [Guerra y col., 2001], ya se describió que el ratón BATIRKO tenía intolerancia a la glucosa con curvas normales de tolerancia a la insulina debido a un defecto en la secreción de dicha hormona. Los resultados obtenidos en el presente modelo así parecían confirmarlo, ya que la concentración de insulina en plasma fue menor en los BATIRKO sometidos a dieta estándar que en el grupo de controles sometidos a la misma dieta (Tabla 7; Figura 23).

Los animales BATIRKO obesos mostraron intolerancia a la insulina, como se refleja en los test de tolerancia a la insulina, comparados con los BATIRKO no obesos y el control sometido a dieta estándar (Figura 23). Mediante el índice de resistencia a la insulina, HOMA-IR, se puso de manifiesto que los animales obesos eran resistentes a la insulina, ya que este índice fue mucho mayor en los BATIRKO HFD que en los STD o en los controles (Tabla 7).

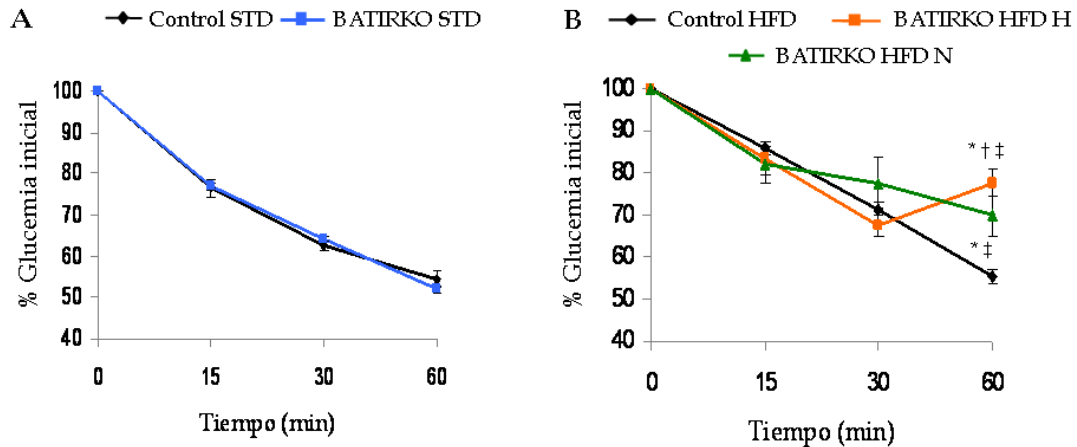


Figura 23. Test de tolerancia a la insulina. Se realizaron los test de tolerancia a la insulina en los grupos control y BATIRKO sometidos a dieta estándar (A) o a dieta rica en grasas (B). * $p < 0.05$ vs. Control STD; † $p < 0.05$ vs. BATIRKO STD; ‡ $p < 0.05$ vs. Control HFD; § $p < 0.05$ vs. BATIRKO HFD H.

Mediante las curvas de tolerancia a la glucosa se pudo observar que los animales sometidos a dieta grasa desarrollaban una intolerancia a la glucosa más acusada que los ratones BATIRKO con dieta STD o que los dos grupos de controles (Figura 24).

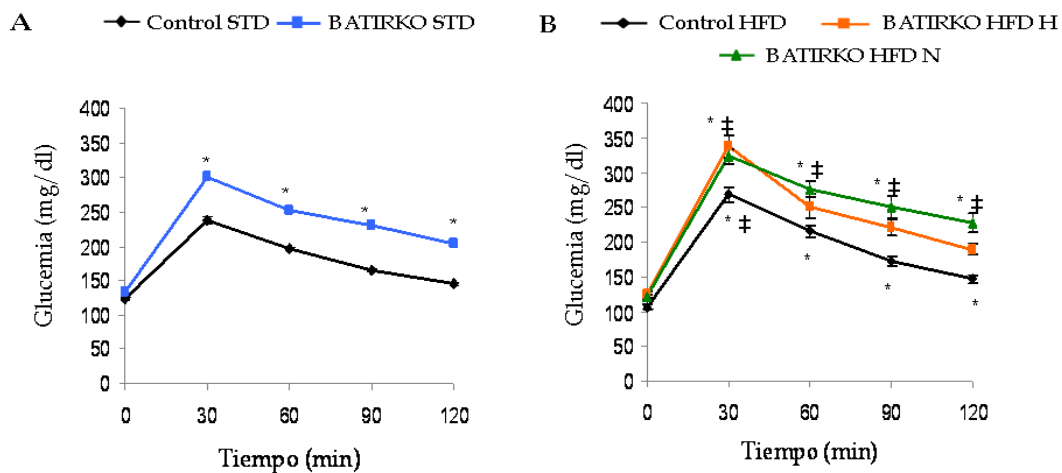


Figura 24. Test de tolerancia a la glucosa. Se realizaron los test de tolerancia a la glucosa en los grupos control y BATIRKO sometidos a dieta estándar (A) o a dieta rica en grasas (B). * $p < 0.05$ vs. Control STD; † $p < 0.05$ vs. BATIRKO STD; ‡ $p < 0.05$ vs. Control HFD; § $p < 0.05$ vs. BATIRKO HFD H.

1.2. DIFERENCIAS EN LOS MECANISMOS COMPENSATORIOS EN RESPUESTA A LA RESISTENCIA A LA INSULINA EN LOS RATONES BATIRKO OBESOS

En el modelo BATIRKO HFD habíamos conseguido generar resistencia a la insulina debido a la obesidad producida por la administración de la dieta grasa. Frente a esa resistencia a la insulina, obtuvimos dos poblaciones de BATIRKO obesos en relación a los niveles de insulina circulantes que tenían al final del estudio. Así, teníamos un primer grupo, minoritario, que era capaz de desarrollar los mecanismos compensatorios habituales frente a la resistencia a la insulina generada mediante una hiperinsulinemia moderada, al que denominamos BATIRKO HFD H (Tabla 7). El segundo grupo, mayoritario, no era capaz de desarrollar dichos mecanismos compensatorios frente a la resistencia a la insulina, mostrando niveles normales de insulina plasmática, lo llamamos BATIRKO HFD N (Tabla 7). Este grupo de ratones BATIRKO que no compensaban la resistencia a la insulina al final del estudio desarrollaron una hiperglucemia moderada en el ayuno (Tabla 7).

Previamente ya hemos apuntado que los ratones BATIRKO STD eran hipoinsulinémicos. Además, estos animales mostraron un ligero descenso en el tamaño del islote pancreático comparado con sus controles (Figura 25). Los dos grupos de BATIRKO obesos presentaron diferencias en el área de la célula β pancreática, además de en el contenido pancreático de insulina. El grupo BATIRKO HFD H mostró hiperplasia de las células β pancreáticas pero sin cambios significativos en el contenido de insulina del islote. Sin embargo, en el grupo BATIRKO HFD N no hubo alteraciones en el tamaño del islote, pero sí un descenso significativo del contenido de insulina. (Figura 25). Estos animales en los que fracasaron los mecanismos compensatorios de la resistencia a la insulina, también tenían una intolerancia a la glucosa más severa y una hiperglucemia en el ayuno moderada, comparados con los BATIRKO obesos hiperinsulinémicos.

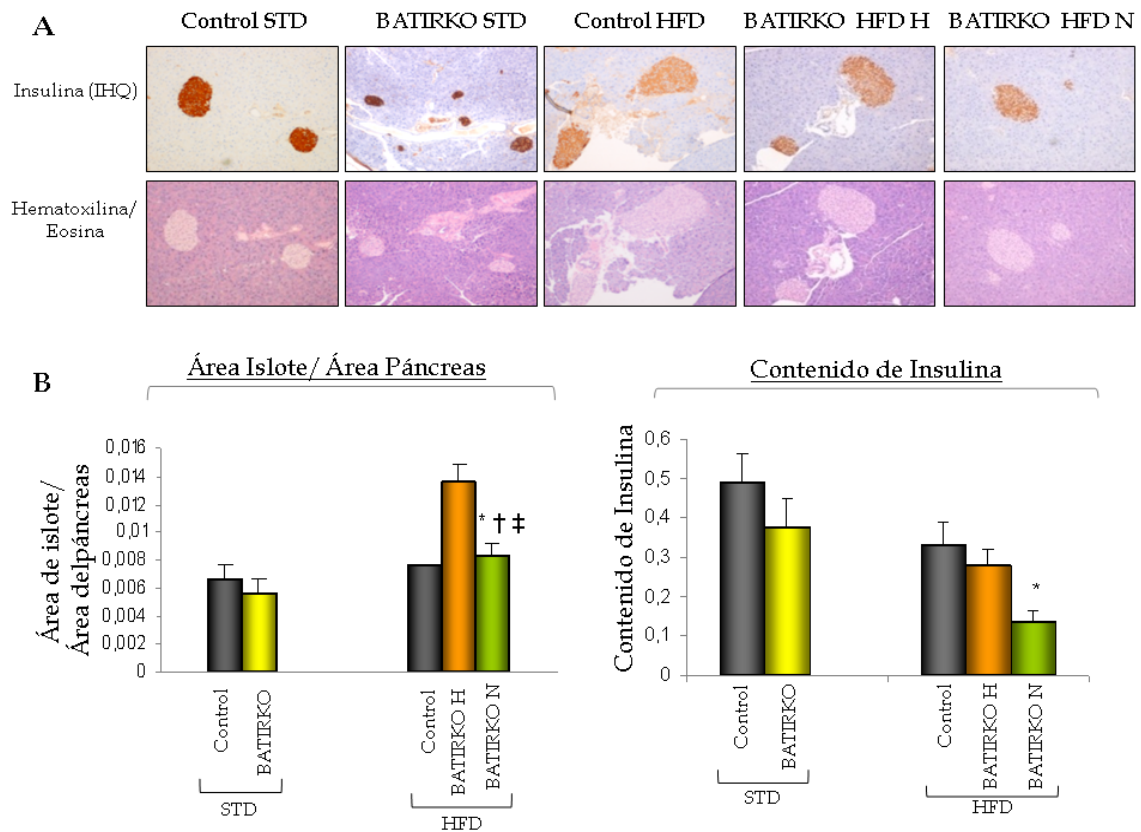


Figura 25. Estudio del páncreas en ratones control y BATIRKO sometidos a dieta STD y HFD. **A)** Inmunohistoquímica (IHQ) frente a la insulina (paneles superiores) y tinción de hematoxilina/eosina (paneles inferiores) del páncreas de los cinco grupos estudiados. La IHQ frente a la insulina, permite observar el contenido de dicha hormona en los islotes pancreáticos. **B)** Cuantificación del área de los islotes pancreáticos respecto al páncreas total y del contenido de insulina en los islotes pancreáticos. * $p < 0.05$ vs. Control STD; † $p < 0.05$ vs. BATIRKO STD; ‡ $p < 0.05$ vs. Control HFD; § $p < 0.05$ vs. BATIRKO HFD H.

Para poder establecer si las diferencias entre los mecanismos compensatorios de los dos grupos de BATIRKO obesos podían deberse a la existencia o no de un mayor fallo en la secreción de insulina, realizamos tests de secreción aguda de insulina en los cinco grupos de animales del estudio. La primera observación realizada fue que los animales BATIRKO sometidos a dieta estándar tenían una menor secreción de insulina en respuesta a la sobrecarga de glucosa que los animales control STD (Figura 26A). Estos datos confirmaron una vez más la hipoinsulinemia observada previamente (Tabla 7). El test de secreción de insulina también mostró que los animales BATIRKO HFD H tenían una concentración de insulina basal mayor que el resto de grupos. A los cinco minutos de la estimulación con glucosa se presentaba un ligero aumento de esta concentración de insulina, pero fracasaba en el momento final del experimento (Figura 26B). Por otro lado, el grupo BATIRKO HFD N sufría un fallo muy severo de la

secreción de insulina, independientemente del tiempo transcurrido tras la estimulación (Figura 26B).

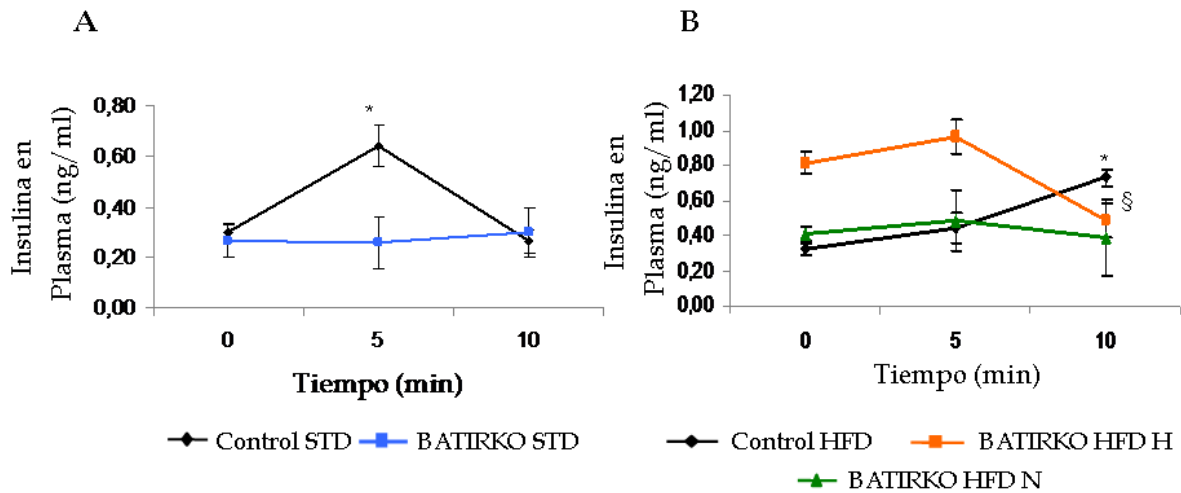


Figura 26. Test de secreción aguda de insulina. Se realizaron los test de secreción aguda a la insulina en los grupos control y BATIRKO sometidos a dieta estándar (A) o a dieta rica en grasas (B). *p<0.05 vs. Control STD; †p<0.05 vs. BATIRKO STD; ‡p<0.05 vs. Control HFD; §p<0.05 vs. BATIRKO HFD H.

Previamente se ha descrito que una sobre-expresión de la proteína UCP-2 en las células β pancreáticas se asocia con un descenso de la secreción de insulina [Chan y col., 1999]. Por ello, nos planteamos que las diferencias de secreción de insulina en ambas poblaciones de ratones BATIRKO obesos podrían deberse a una expresión diferencial de UCP-2 en el páncreas. Estudiamos el nivel de expresión de ARNm de UCP-2 en los islotes pancreáticos, y de proteína por inmunohistoquímica, en cortes de páncreas total. Observamos un aumento significativo de la expresión de UCP-2 tanto en el ARNm (Figura 27C) como en la proteína (Figura 27A y B) en el islote pancreático de los ratones BATIRKO HFD N. A continuación, estudiamos si la expresión diferencial de UCP-2 en el páncreas podía deberse a una expresión diferencial de UCP-1 en el tejido adiposo marrón de los animales BATIRKO obesos. Observamos un aumento significativo de la expresión de UCP-1 tanto en ARNm (Figura 28C) como en proteína (Figura 28A y B) en el BAT de los BATIRKO HFD N. Para comprobar si realmente se relacionaba el aumento de ambas proteínas en los dos tejidos de estos animales, realizamos una correlación estadística y comprobamos que el aumento de expresión de ARNm de UCP-1 en BAT y de UCP-2 en los islotes pancreáticos tenía una correlación positiva y significativa en todos los grupos (Figura 29).

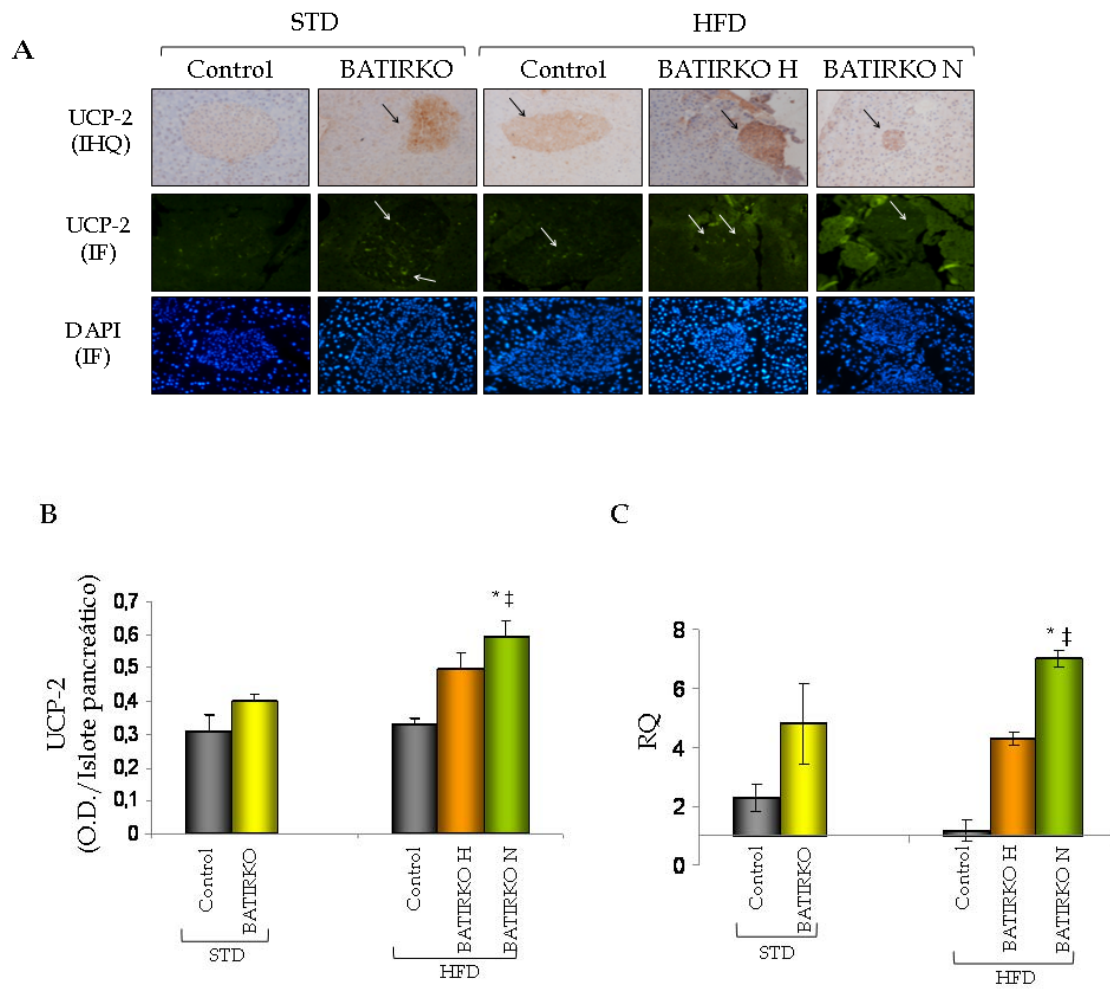


Figura 27. Expresión de UCP-2 en el páncreas de ratones control y BATIRKO. Inmunohistoquímica (A) y cuantificación (B) de UCP-2 en los cortes del páncreas total. Se expresó como tinción positiva de UCP-2 por islote pancreático. C) Expresión del ARNm de UCP-2 en los islotes pancreáticos de los cinco grupos estudiados por qRT-PCR. * $p < 0.05$ vs. Control STD; † $p < 0.05$ vs. BATIRKO STD; ‡ $p < 0.05$ vs. Control HFD; § $p < 0.05$ vs. BATIRKO HFD H.

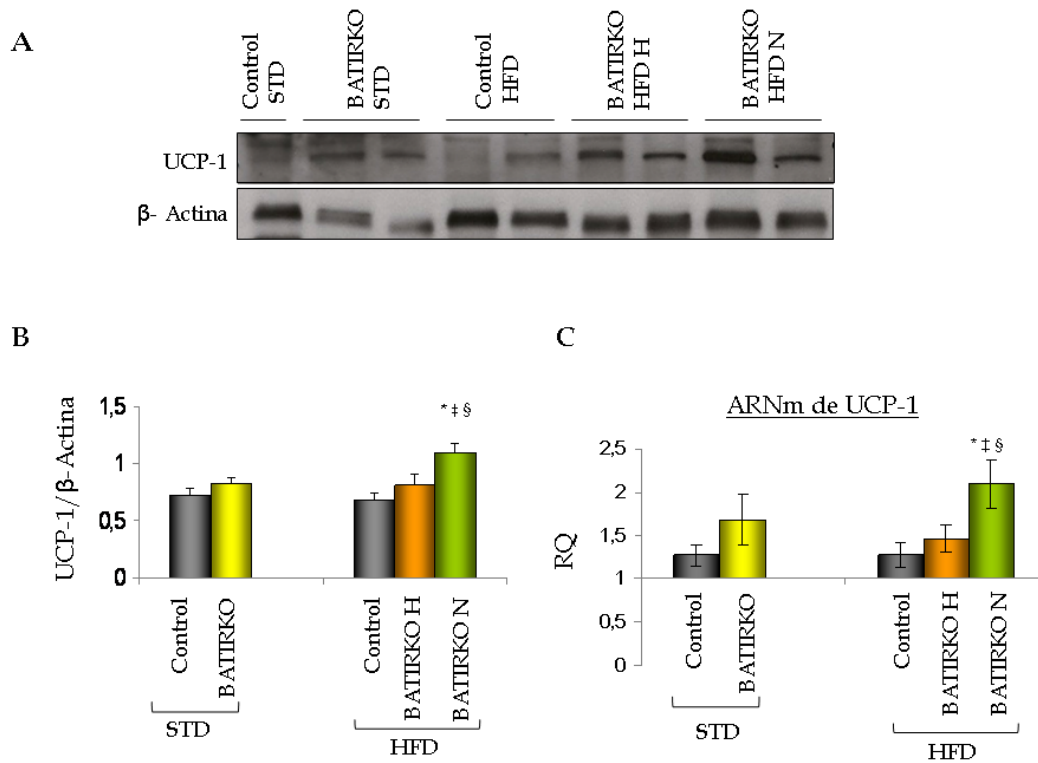


Figura 28. Expresión de UCP-1 en el tejido adiposo marrón. Estudio de los niveles de proteína de UCP-1 mediante Western blot en el BAT y cuantificación de dicha proteína respecto a la β -actina (A y B, respectivamente). C) Expresión del ARNm de UCP-1 en el BAT de los cinco grupos estudiados. * $p < 0.05$ vs. Control STD; † $p < 0.05$ vs. BATIRKO STD; ‡ $p < 0.05$ vs. Control HFD; § $p < 0.05$ vs. BATIRKO HFD H.

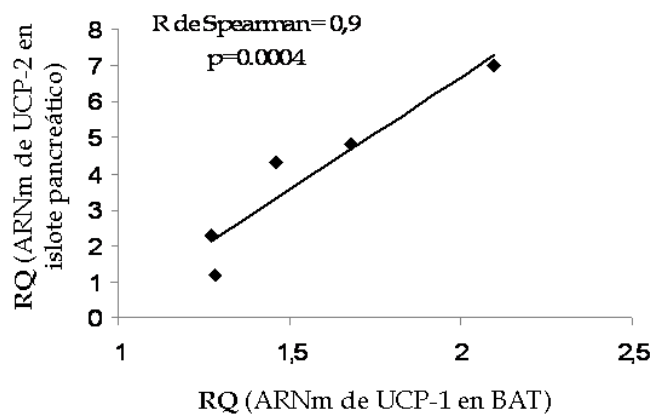


Figura 29. Correlación de la expresión del ARN mensajero de UCP-1 y de UCP-2 en BAT y en los islotes pancreáticos de ratones control y BATIRKO.

Realizamos estudios de la señalización de insulina en el tejido adiposo marrón de los animales y observamos que la delección del IR en este tejido provocó una resistencia primaria a la acción de la insulina, independientemente de la dieta a la que se sometían los animales BATIRKO (Figura 30).

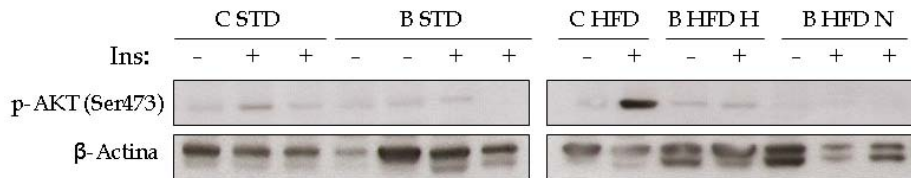


Figura 30. Señalización *in vivo* de la insulina en el tejido adiposo marrón. Se analizó mediante Western blot la fosforilación en el residuo de Ser473 de Akt en el BAT de los cinco grupos estudiados que han sido estimulados con insulina (+) o con salino (-). Se utilizó la β-actina como control de carga.

El tejido adiposo marrón, además de su acción termogénica, también tiene una función secretora. Algunas de las moléculas que secreta son citoquinas proinflamatorias y adipocinas como TNF- α , leptina, adiponectina y PAI-1. Observamos que los ratones BATIRKO obesos tenían un aumento significativo de la expresión del ARNm y de la proteína, de las citoadipoquinas inflamatorias en el BAT (Figura 31A y B, respectivamente), pero con patrones diferentes. TNF- α y PAI-1 tuvieron un aumento significativo mucho mayor en el grupo BATIRKO HFD N que en el H, a pesar de que ambos estaban sometidos a la misma situación de dieta grasa. Sin embargo, ambos grupos presentaron un aumento similar de la expresión de leptina, hecho común para los dos grupos de BATIRKO HFD al igual que la obesidad generada en ambos. En cuanto a la adipocina anti-inflamatoria, adiponectina, se observó que el grupo BATIRKO normoinsulinémico tenía un descenso significativo en su expresión respecto al ratón BATIRKO hiperinsulinémico. Al estudiar la expresión de la proteína observamos que los datos de ARNm se confirman, apareciendo un mayor aumento de las citoquinas inflamatorias y un descenso significativo de adiponectina en los ratones obesos normoinsulinémicos, comparado con todos los demás grupos (Figura 31B).

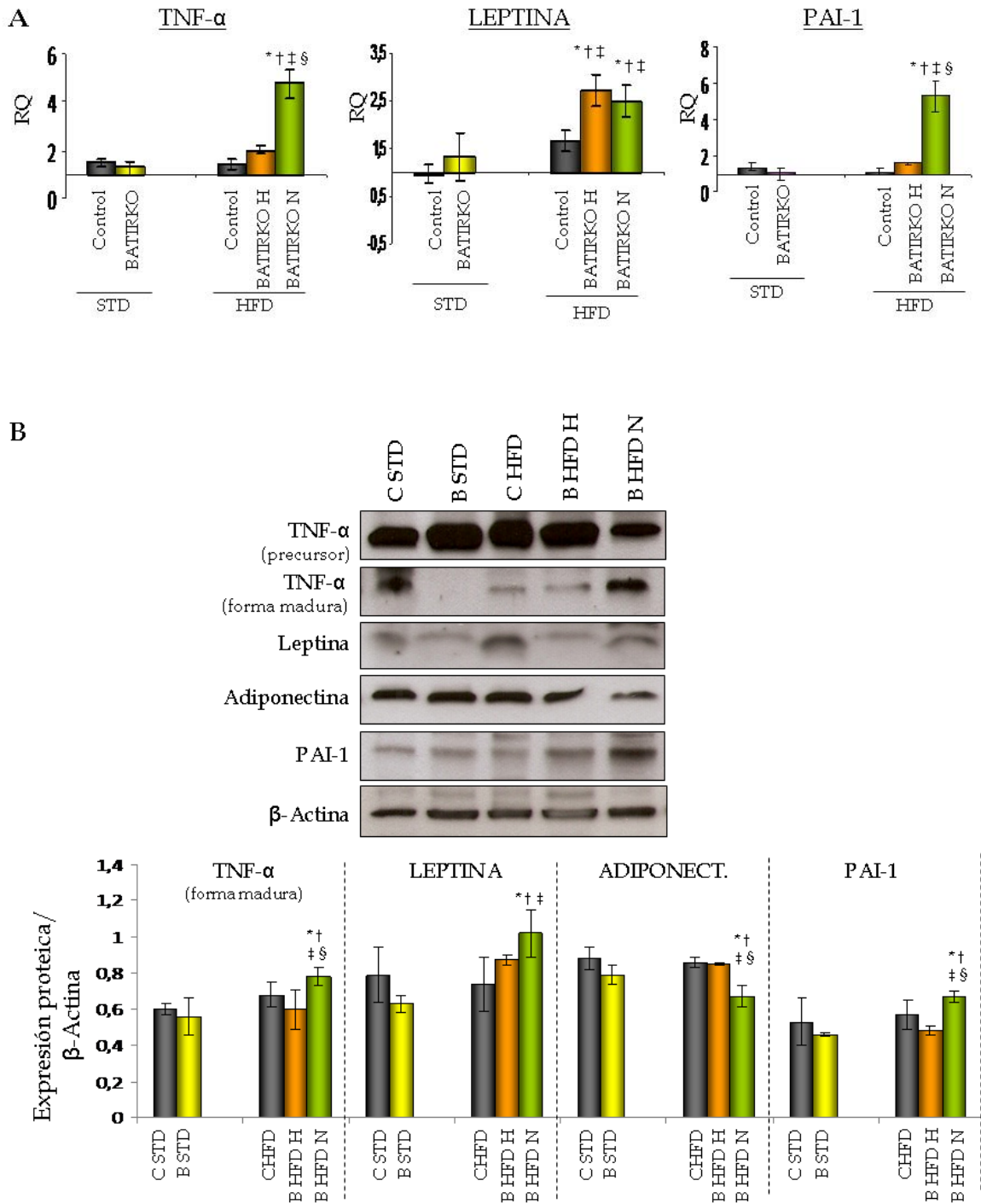


Figura 31. Citoquinas producidas por el tejido adiposo marrón **A)** Expresión del ARNm de TNF- α , leptina y PAI-1 en el BAT de los cinco grupos estudiados por qRT-PCR. **B)** Análisis mediante Western blot de los niveles proteicos de TNF- α , leptina, adiponectina y PAI-1 en el BAT de los cinco grupos estudiados. En el panel superior aparecen las imágenes representativas y en inferior, la cuantificación respecto a la β -actina. * $p < 0.05$ vs. Control STD; † $p < 0.05$ vs. BATIRKO STD; ‡ $p < 0.05$ vs. Control HFD; § $p < 0.05$ vs. BATIRKO HFD H.

Una vez estudiada la señalización *in vivo* de insulina y el perfil diferencial secretor del BAT de los dos grupos de BATIRKO obesos, y a la vista de que ambos grupos tenían un aumento de la masa visceral del tejido adiposo blanco, nos planteamos estudiar la señalización *in vivo* de la insulina y el comportamiento como órgano secretor del WAT.

En primer lugar, se estudió la señalización *in vivo* de la insulina en el WAT y se observó que los ratones BATIRKO sometidos a HFD normoinsulinémicos mostraban un descenso significativo de la sensibilidad a la acción de la insulina (Figura 32). Sin embargo, los animales BATIRKO HFD con hiperinsulinemia moderada sufrían una recuperación completa de la señalización de la hormona.

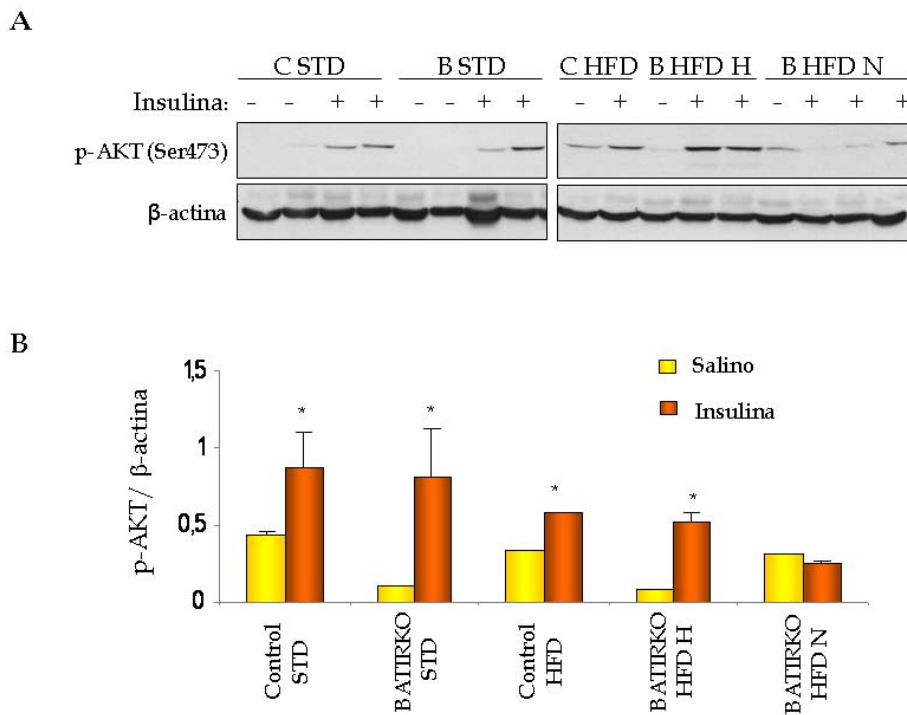


Figura 32. Señalización *in vivo* de la insulina en el tejido adiposo blanco. A) Análisis mediante Western blot de la fosforilación en el residuo de Ser473 de Akt en el WAT de los distintos grupos estudiados en respuesta a insulina. B) Cuantificación de dicha señalización. * $p < 0.05$ vs. Tratamiento con salino.

Al igual que el BAT, el WAT también tiene una función secretora. Al estudiar el perfil de las adipoquinas sintetizadas en el WAT (Figura 33), observamos un aumento significativo en la expresión del ARNm de leptina en ambos grupos de BATIRKO obesos (Figura 33C). En el caso del TNF- α se observó un aumento estadísticamente

significativo en el WAT de los ratones BATIRKO HFD N en relación con los BATIRKO obesos hiperinsulinémicos (Figura 33A). Asimismo, en los animales hiperinsulinémicos, la expresión del ARNm de PAI-1 disminuyó, aunque este descenso no fue estadísticamente significativo. En los BATIRKO obesos normoinsulinémicos, se produjo un aumento significativo de la expresión de PAI-1 respecto a todos los grupos estudiados (Figura 33B). Por el contrario, la adiponectina sufrió un descenso significativo en la expresión del ARNm en los normoinsulinémicos, mientras que en los hiperinsulinémicos experimentó un aumento de su expresión, si bien, éste no fue significativo (Figura 33C).

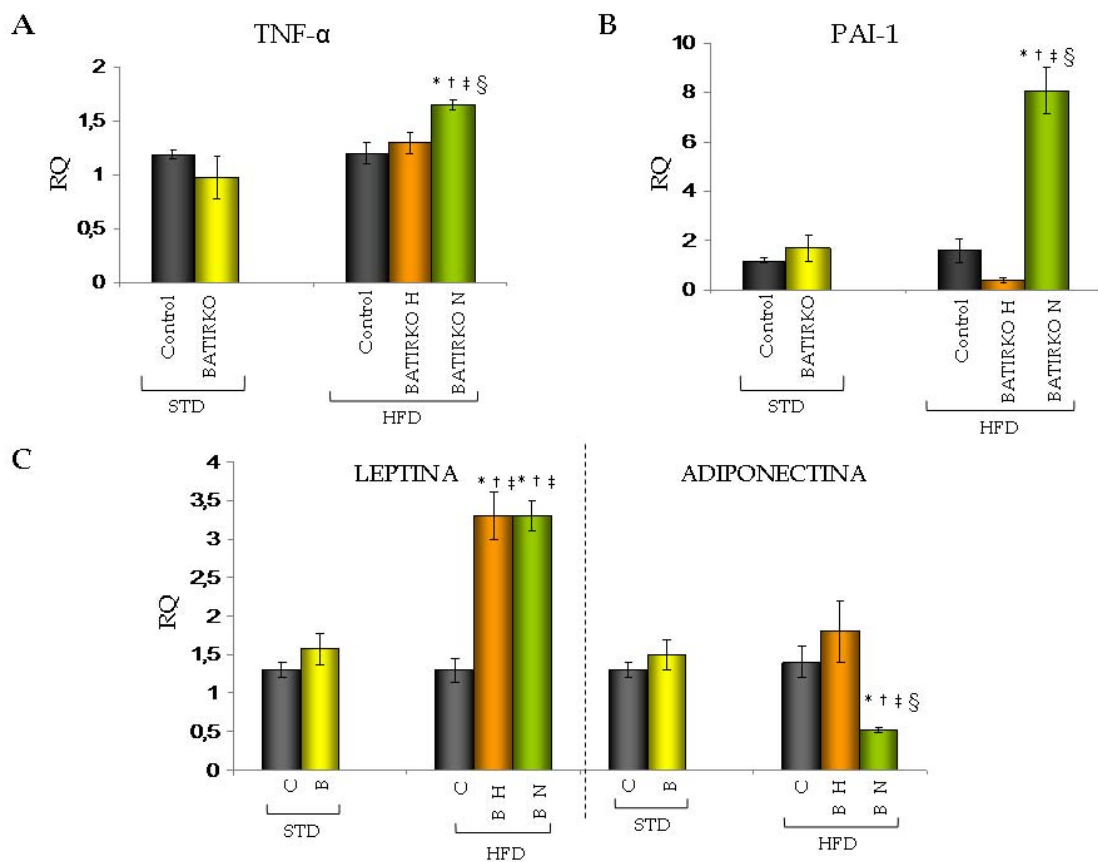
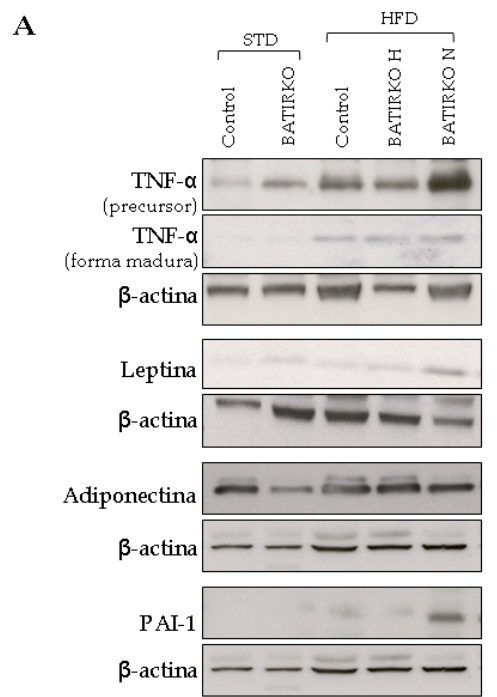


Figura 33. Expresión del ARNm de las citoadipoquinas en el tejido adiposo blanco. Se analizó por qRT-PCR la expresión del ARNm de TNF- α (A), PAI-1 (B), leptina y adiponectina (C). * $p < 0.05$ vs. Control STD; † $p < 0.05$ vs. BATIRKO STD; ‡ $p < 0.05$ vs. Control HFD; § $p < 0.05$ vs. BATIRKO HFD H.

Además, comprobamos que las variaciones observadas en la expresión de las citoquinas y adipoquinas con respecto al ARNm se correspondían con los cambios encontrados en la proteína. En la Figura 34, observamos que el grupo de obesos normoinsulinémicos mostraba un aumento significativo de la cantidad de proteína de

TNF- α , leptina y PAI-1 respecto a los demás grupos, mientras que los niveles de adiponectina fueron inferiores de forma estadísticamente significativa al compararlos con todos los grupos. Sin embargo, los BATIRKO obesos que compensaron la resistencia a la insulina, tenían aumentados los niveles de leptina pero TNF- α , adiponectina y PAI-1 mostraron una expresión proteica similar a los controles sometidos a dieta grasa, no encontrándose diferencias significativas entre ambos grupos (Figura 34).



B

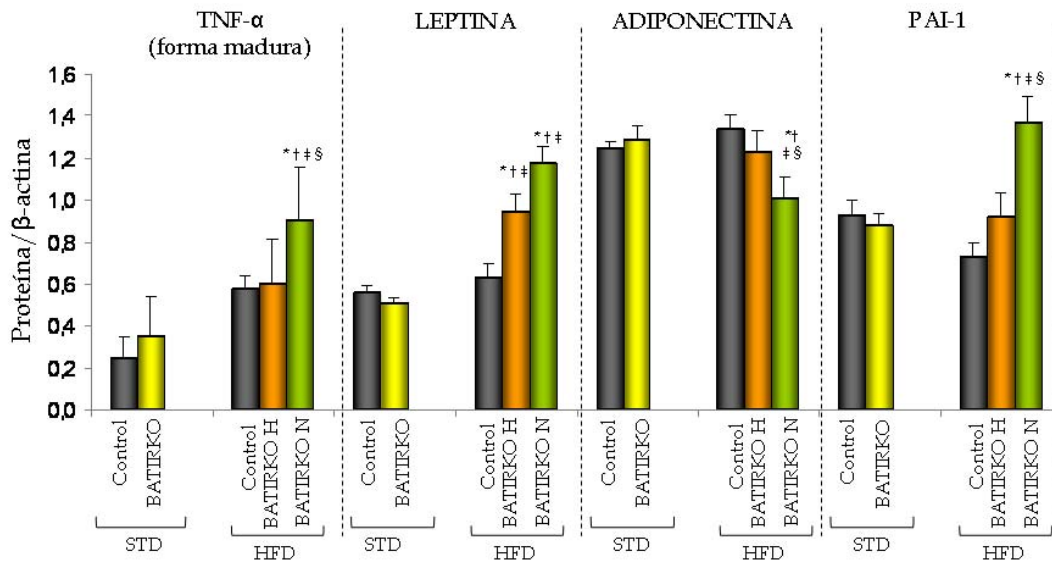


Figura 34. Análisis por Western blot de los niveles proteicos de citoquinas producidas por el tejido adiposo blanco. Western blot representativos (A) y cuantificación (B) de los niveles de proteína de TNF- α , leptina, adiponectina y PAI-1 en el WAT de los cinco grupos estudiados. Se utilizó la β -actina como control de carga. * $p < 0.05$ vs. Control STD; † $p < 0.05$ vs. BATIRKO STD; ‡ $p < 0.05$ vs. Control HFD; § $p < 0.05$ vs. BATIRKO HFD H.

Estas diferencias en la expresión del ARNm y de la proteína de las citoadipoquinas sintetizadas en ambos tejidos adiposos, se correlacionaron con las concentraciones circulantes de las mismas (Tabla 8). Así, los dos grupos de BATIRKO obesos que presentaban un incremento significativo de la expresión de leptina en ambos tejidos adiposos, tenían un aumento significativo de los niveles circulantes de leptina (Tabla 8). Los animales obesos que no compensaron la resistencia a la insulina, mostraron concentraciones plasmáticas muy elevadas de TNF- α , pero unos niveles más bajos de adiponectina (Tabla 8) al igual que habíamos observado en los niveles de expresión en ambos tejidos adiposos. Todas estas modificaciones de expresión de las citoquinas proinflamatorias y de las adipoquinas en los tejidos adiposos, junto con la variación de las concentraciones de citoquinas circulantes, alterarían el metabolismo de los ratones, principalmente en el grupo de BATIRKO obeso que no compensa la resistencia a la insulina.

	Control STD	BATIRKO STD	Control HFD	BATIRKO HFD H	BATIRKO HFD N
TNF- α (pg/mL)	6.4 \pm 1.3	6.3 \pm 1	5.5 \pm 1	4.5 \pm 0.5	26.9 \pm 19 ^{**§}
Leptina (ng/mL)	2.8 \pm 0.3	3.8 \pm 0.6	1.9 \pm 1.1	5.7 \pm 1.1 ^{*†}	4.7 \pm 0.3 ^{*††}
Adiponectina(μ g/mL)	7.5 \pm 0.7	7.2 \pm 0.6	7.1 \pm 0.5	8.8 \pm 1.2	5.3 \pm 0.6 ^{**§}

Tabla 8. Concentraciones plasmáticas de las citoquinas y adipocinas secretadas por los tejidos adiposos. *p<0.05 vs. Control STD; †p<0.05 vs. BATIRKO STD; ††p<0.05 vs. Control HFD; §p<0.05 vs. BATIRKO HFD H.

Teniendo en cuenta que hemos generado un modelo de resistencia a la insulina como consecuencia de la obesidad producida por la administración de dieta rica en grasas, analizamos el perfil lipídico de los cinco grupos del modelo. Así, en la tabla 9, se puede observar que ambos grupos de BATIRKO obesos tenían un perfil lipídico diferente a las 33 semanas. El grupo de ratones BATIRKO obesos hiperinsulinémicos mostró un incremento significativo de la concentración de TGDs y las cHDL, pero sin cambios en los niveles de cLDL. Sin embargo, el grupo de ratones BATIRKO obesos normoinsulinémicos no tuvieron cambios significativos en las concentraciones de TGDs y cHDL, pero sí un ligero incremento de la concentración plasmática de cLDL comparado con los controles. Es de especial interés el hecho de que el ratón BATIRKO obeso normoinsulinémico, que tiene tres veces más alto el ratio cLDL/cHDL que el ratón BATIRKO obeso hiperinsulinémico, posee mayor riesgo cardiovascular (Tabla 9).

	Control STD	BATIRKO STD	Control HFD	BATIRKO HFD H	BATIRKO HFD N
TG (mg/dL)	31.8 \pm 1.4	32.4 \pm 3.3	22.8 \pm 3.1	44.6 \pm 6.6*	26.7 \pm 6.1
Glicerol (mg/dL)	9.1 \pm 1.1	17.7 \pm 3.2	9.15 \pm 1.1	13.6 \pm 4.6	11.2 \pm 3.2
Colesterol(mg/dL)	86.6 \pm 6.6	75.5 \pm 7	97.9 \pm 15.6	125.2 \pm 41.1	86.54 \pm 16.6
cLDL (mg/dL)	55.2 \pm 9	51.4 \pm 10.9	42.15 \pm 7.2	51.8 \pm 16.1	64.6 \pm 24.4
cHDL (mg/dL)	44.9 \pm 7	39.3 \pm 3	32.4 \pm 8	106.4 \pm 26 ^{*††}	38.1 \pm 23 [§]
cLDL/cHDL	1.2 \pm 0.2	1.3 \pm 0.3	1.3 \pm 0.7	0.5 \pm 0.5	1.7 \pm 0.3

Tabla 9. Perfil lipídico de los ratones a las 33 semanas. *p<0.05 vs. Control STD; †p<0.05 vs. BATIRKO STD; ††p<0.05 vs. Control HFD; §p<0.05 vs. BATIRKO HFD H.

1.3. DIFERENCIAS EN LA FUNCIÓN VASCULAR DE LOS GRUPOS OBESOS DE BATIRKO

Es conocido que la resistencia a la insulina y la obesidad producen multitud de alteraciones en el endotelio que podrían provocar disfunción vascular [Steinberg, H. O. y Baron 2002]. Por este motivo, estudiamos en primer lugar la función endotelial en nuestro modelo animal. Se analizó la función dependiente de endotelio como respuesta de vasorrelajación inducida por acetilcolina (ACh) (Figura 35A). Tanto los controles como los animales BATIRKO STD así como los controles HFD y los BATIRKO obesos hiperinsulinémicos presentaron respuestas de relajación a ACh similares, entre el 60 y el 70%. Sin embargo, los ratones BATIRKO obesos que no compensaban la resistencia a la insulina y que tenían un peor perfil metabólico además de un perfil lipídico más aterogénico, presentaron una reducción significativa de la respuesta de vasorrelajación inducida por la acetilcolina (~35%). Este descenso en la respuesta inducida por ACh se correlacionó con un descenso significativo en la expresión, tanto del ARNm como de la proteína, del enzima eNOS en la arteria aorta (Figura 35B y C). Estos resultados sugieren que el grupo de ratones BATIRKO obesos que no compensan la resistencia a la insulina tenían disfunción endotelial.

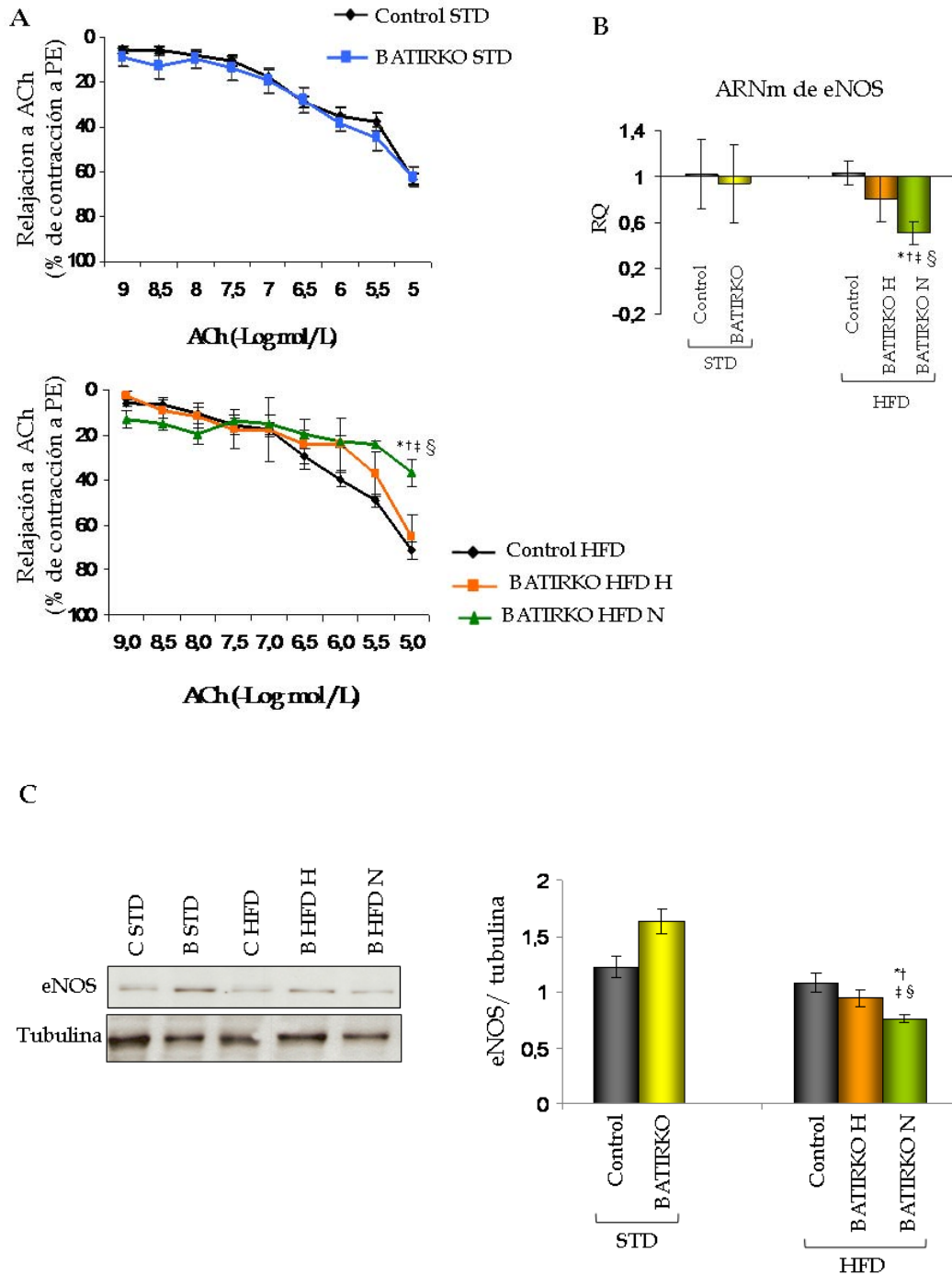


Figura 35. Estudio de la función endotelial en la arteria aorta de ratones controles y BATIRKO. **A)** Curvas de dosis-respuesta a ACh en anillos aórticos precontraídos con fenilnefrina (PE). En la gráfica superior, ratones con dieta estándar y en la inferior, animales sometidos a dieta grasa. **B)** Análisis mediante qRT-PCR de la expresión del ARNm del enzima eNOS en la arteria aorta de los cinco grupos del estudio. **C)** Expresión de la proteína eNOS mediante Western blot. A la izquierda, se encuentran los geles representativos de WB y a la derecha, la cuantificación respecto a α -tubulina. * $p < 0.05$ vs. Control STD; † $p < 0.05$ vs. BATIRKO STD; ‡ $p < 0.05$ vs. Control HFD; § $p < 0.05$ vs. BATIRKO HFD H.

Por otro lado, la función independiente de endotelio como respuesta de relajación inducida por nitroprusiato sódico (SNP) fue comparable en todos los grupos y prácticamente alcanzaron el 100% de relajación a la dosis máxima de SNP (Figura 36).

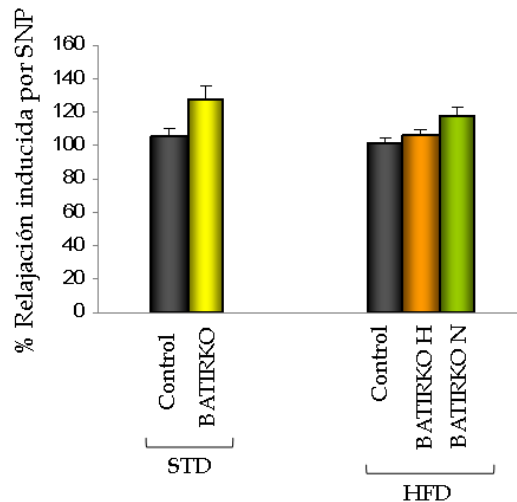


Figura 36. Estudio de la función independiente de endotelio de ratones control y BATIRKO. Respuesta de relajación inducida por el nitroprusiato sódico (SNP, a 10^{-6} M) en los anillos aórticos de los grupos estudiados. * $p < 0.05$ vs. Control STD; † $p < 0.05$ vs. BATIRKO STD; ‡ $p < 0.05$ vs. Control HFD; § $p < 0.05$ vs. BATIRKO HFD H.

Además, estudiamos la respuesta frente a diferentes agentes vasoconstrictores como el análogo del TxA_2 (U46619) y la angiotensina II (Ang II) en los anillos aórticos de los cinco grupos (Figura 37). Observamos que los grupos control y BATIRKO STD respondieron de forma similar al TxA_2 , mientras que en los grupos HFD hubo diferencias, mostrando los ratones BATIRKO una mayor respuesta contráctil que el grupo control, aunque sólo fue estadísticamente significativa en el caso de los normoinsulinémicos (Figura 37A). Sin embargo, la respuesta a la AngII fue mucho más clara, observándose un aumento significativo en la contractilidad del grupo BATIRKO HFD N respecto a los otros grupos estudiados (Figura 37B). Estos resultados sugerían que únicamente el grupo de ratones BATIRKO obesos que no compensaban la resistencia a la insulina mostraba disfunción endotelial y mayor hipercontractilidad, y, por tanto, tenía disfunción vascular.

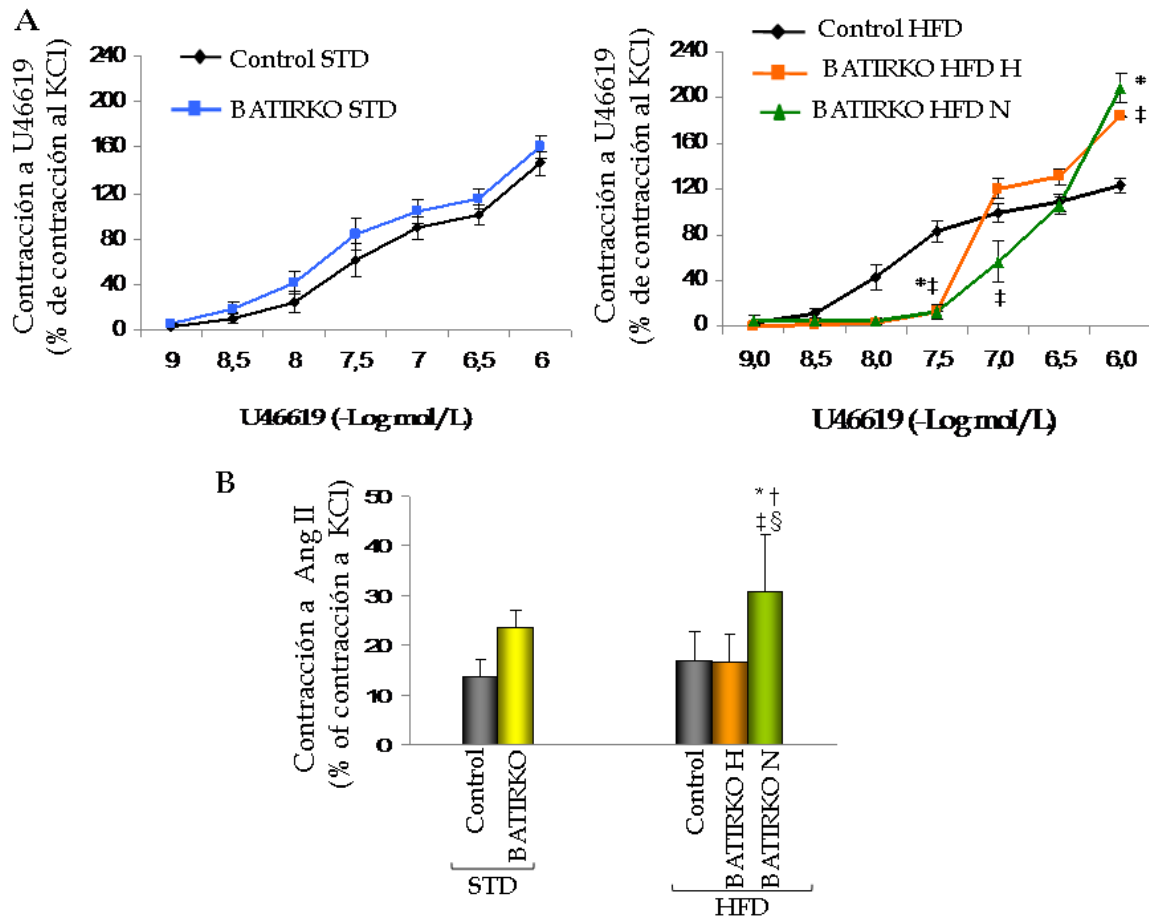


Figura 37. Estudio de la contractilidad vascular en anillos aórticos de ratones control y BATIRKO. **A)** Dosis respuesta inducida por el análogo del Tx_{A2} (U46619) en animales control y BATIRKO sometidos a dieta estándar y grasa. **B)** Respuesta contráctil frente a la angiotensina II (10⁻⁶M) en anillos aórticos de los grupos estudiados. *p<0.05 vs. Control STD; †p<0.05 vs. BATIRKO STD; ‡p<0.05 vs. Control HFD; §p<0.05 vs. BATIRKO HFD H.

1.4. EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE LOS FACTORES DE RIESGO VASCULAR EN LOS RATONES BATIRKO OBESOS

Como parámetros de daño vascular se estudiaron la acumulación de lípidos y el área de lesión en la capa íntima de los arcos aórticos. Entre los cinco grupos de ratones descritos, el grupo de los ratones BATIRKO obesos normoinsulinémicos fue el que, de nuevo, mostró diferencias significativas respecto a los demás grupos, observándose un mayor contenido lipídico y un aumento del área de la lesión en la región del arco aórtico (Figura 38).

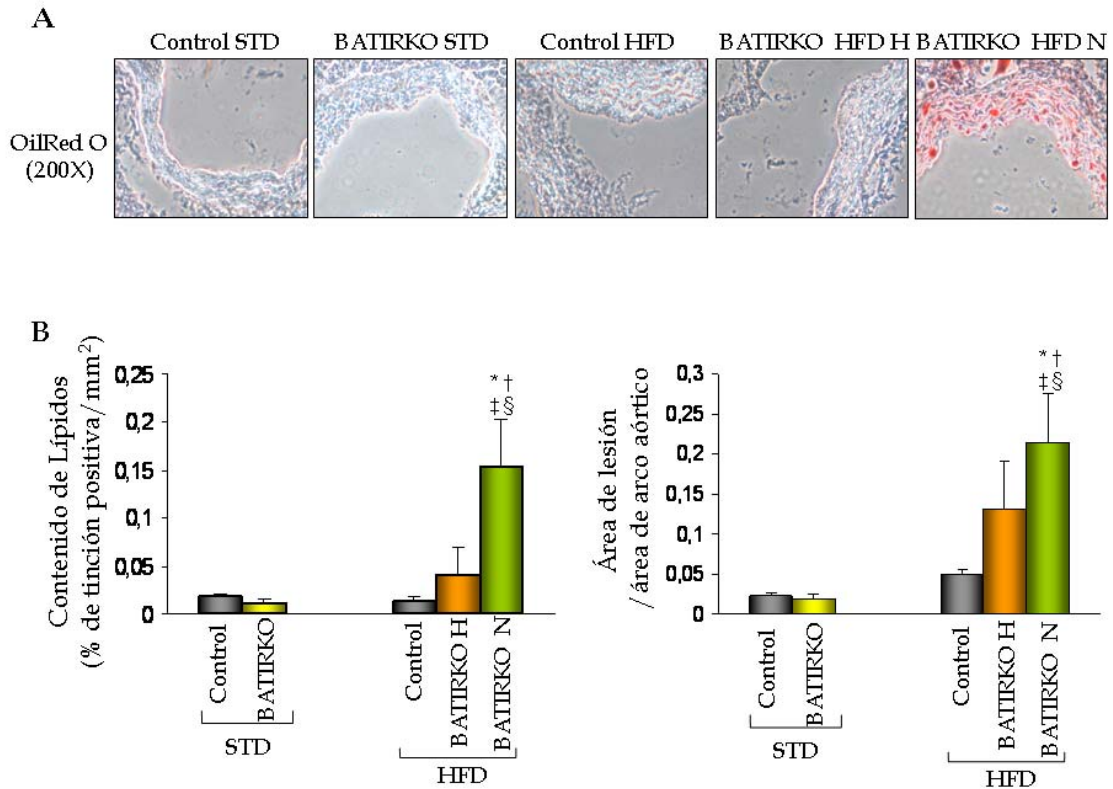


Figura 38. Análisis morfométrico del arco aórtico de ratones control y BATIRKO. **A)** Tinción con OilRedO del arco aórtico de ratones control y BATIRKO con ambos tipos de dieta. **B)** Cuantificación del contenido lipídico y del área de lesión en los arcos aórticos. * $p < 0.05$ vs. Control STD; † $p < 0.05$ vs. BATIRKO STD; ‡ $p < 0.05$ vs. Control HFD; § $p < 0.05$ vs. BATIRKO HFD H.

Mediante inmunohistoquímica, estudiamos el infiltrado de macrófagos en la neointima de los arcos aórticos de todos los grupos estudiados. Observamos un aumento estadísticamente significativo del número de macrófagos en el arco aórtico de los ratones BATIRKO obesos que no compensan la resistencia a la insulina en relación con los otros grupos estudiados (Figure 39A y B). En este mismo sentido, mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real, observamos que los niveles máximos de expresión del ARNm de MCP-1 se encontraban en los anillos aórticos de los BATIRKO HFD N (Figure 39C). Además, también aumentó de manera notoria la expresión de otras citoquinas proinflamatorias, como TNF- α y sus receptores (especialmente TNFR2), en la arteria aorta del mismo grupo de ratones BATIRKO obesos (Figura 40).

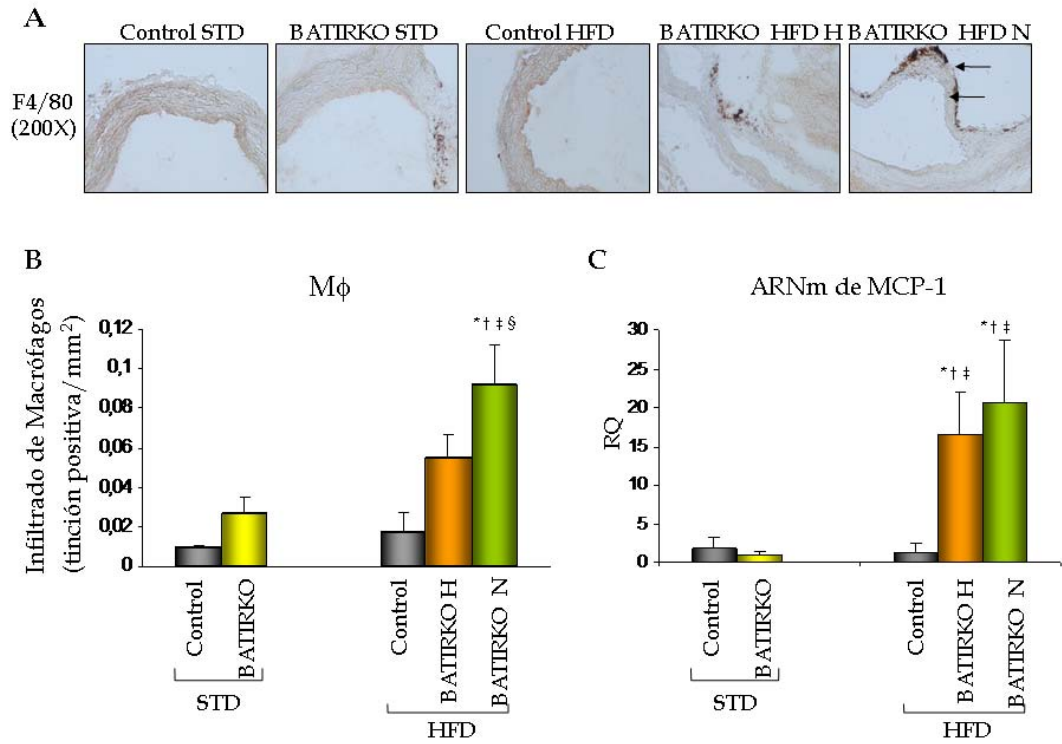


Figura 39. Estudio de la inflamación en las arterias aortas de ratones control y BATIRKO. **A)** Inmunohistoquímica frente a F4/80, que mide el infiltrado de macrófagos, en los arcos aórticos de los grupos estudiados. **B)** Cuantificación del infiltrado de macrófagos, expresado como tinción positiva por área del arco aórtico. **C)** Análisis por qRT-PCR de la expresión del ARNm de MCP-1 en la arteria aorta de los grupos estudiados. * $p < 0.05$ vs. Control STD; † $p < 0.05$ vs. BATIRKO STD; ‡ $p < 0.05$ vs. Control HFD; § $p < 0.05$ vs. BATIRKO HFD H.

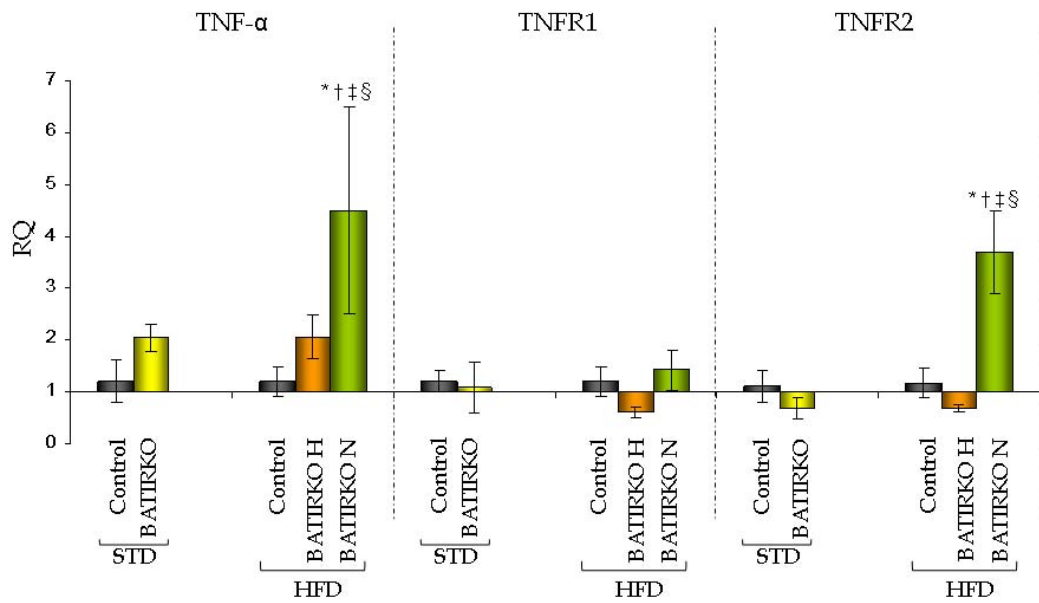
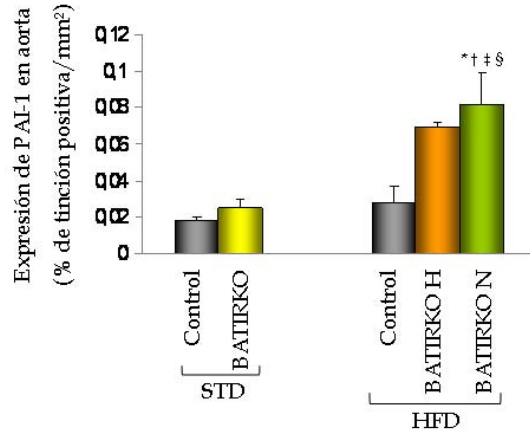
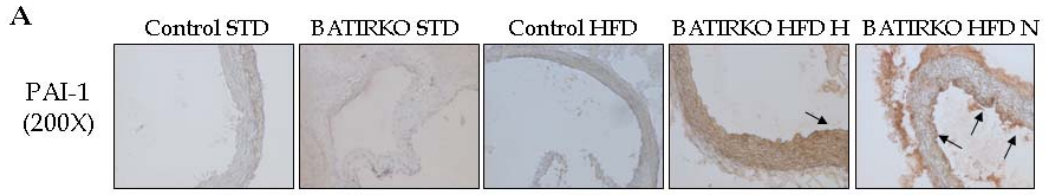
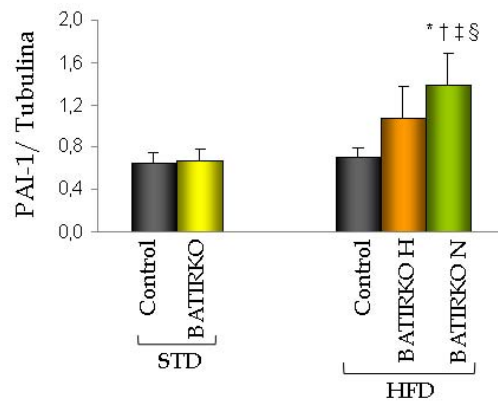
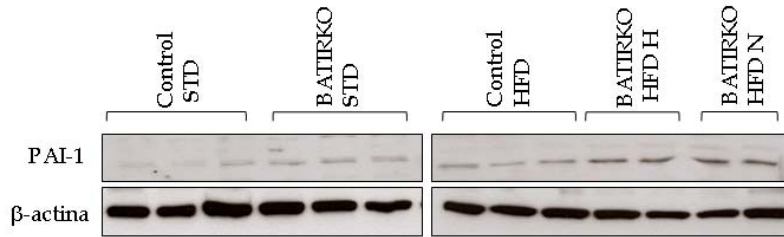


Figura 40. Expresión del ARNm del TNF- α y sus receptores en la arteria aorta de ratones control y BATIRKO. La expresión del ARNm de los genes analizados se estudió mediante PCR cuantitativa a tiempo real. * $p < 0.05$ vs. Control STD; † $p < 0.05$ vs. BATIRKO STD; ‡ $p < 0.05$ vs. Control HFD; § $p < 0.05$ vs. BATIRKO HFD H.

Otro parámetro estudiado que aportaba más evidencias de la presencia de mayor daño vascular en la arteria aorta del grupo de ratones de BATIRKO obesos normoinsulinémicos fue la sobreexpresión de PAI-1, tanto en la arteria aorta como en el arco aórtico (Figura 41).



B



C

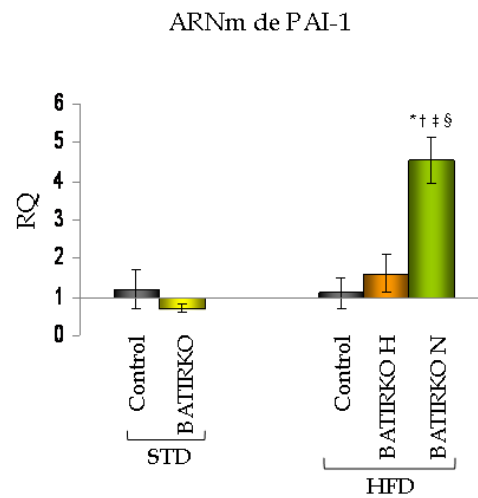


Figura 41. Expresión de PAI-1 en el arco aórtico y en la arteria aorta de ratones control y BATIRKO. A) Fotografías representativas de la inmunohistoquímica (IHQ) de PAI-1 en el arco aórtico de los cinco grupos estudiados. En la parte inferior se encuentra la cuantificación de dicha IHQ que está expresada como % de tinción positiva por área. B) Análisis por Western blot de los niveles proteicos de PAI-1 en las arterias aortas de los grupos estudiados. En la parte inferior se encuentra la cuantificación de dicho WB, en el que se ha utilizado la β -actina como control de carga. C) Análisis por RT-PCR cuantitativa a tiempo real del ARNm de PAI-1 en las arterias aortas de los cinco grupos estudiados.* $p < 0.05$ vs. Control STD; † $p < 0.05$ vs. BATIRKO STD; ‡ $p < 0.05$ vs. Control HFD; § $p < 0.05$ vs. BATIRKO HFD H.

1.5. EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE TNF- α Y UCP-2 EN LA ARTERIA AORTA DE LOS BATIRKO OBESOS

Previamente ya hemos descrito que en los estados de resistencia a la insulina asociados con obesidad, puede tener lugar la movilización de lípidos procedentes del WAT visceral hacia otros tejidos periféricos. También, hemos observado una acumulación lipídica diferencial en los arcos aórticos de ambos grupos de BATIRKO obesos.

Por otro lado, se ha descrito que la sobre-expresión de UCP-2 induce la β -oxidación de ácidos grasos de cadena larga [Chan y col., 2001] y podría tener un papel protector frente a la aterosclerosis [Blanc y col., 2003]. En esta línea, nosotros hemos observado un aumento estadísticamente significativo en la expresión del ARNm de UCP-2 en la arteria aorta de los ratones BATIRKO HFD H comparado con el grupo de los normoinsulinémicos (Figura 42). Así, la sobre-expresión de UCP-2 podría ser uno de los mecanismos implicados en la atenuación del daño vascular observada en los BATIRKO obesos hiperinsulinémicos.

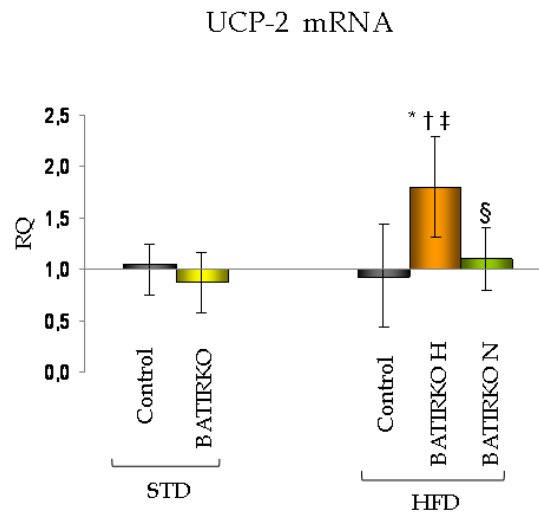
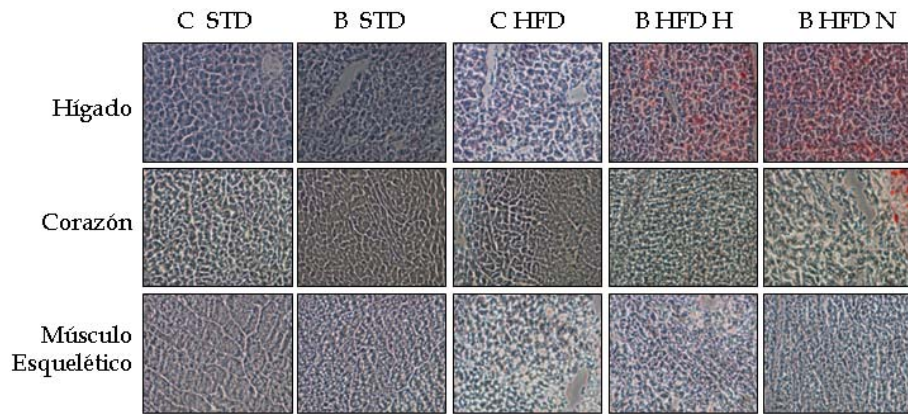


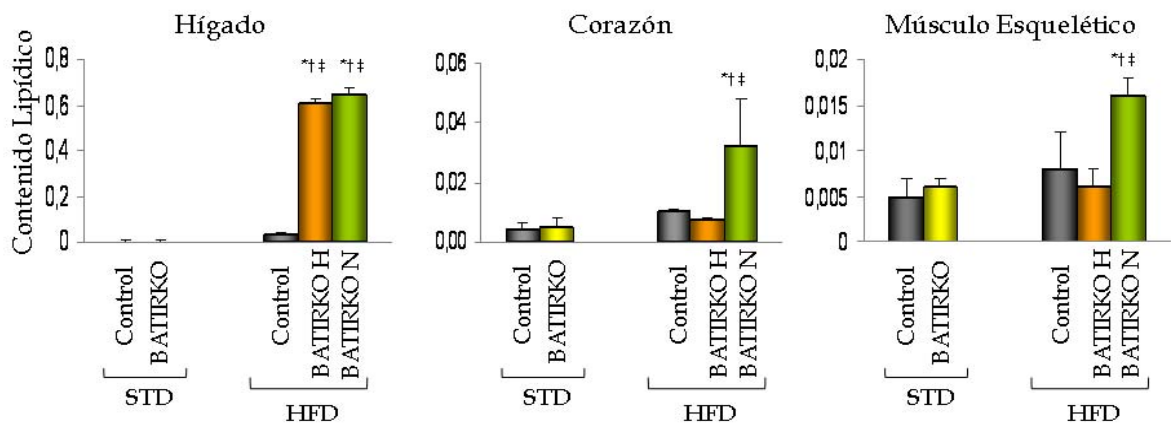
Figura 42. Expresión del ARNm de UCP-2 en la arteria aorta de ratones control y BATIRKO. La expresión del ARNm de UCP-2 se estudió mediante PCR cuantitativa a tiempo real. * $p < 0.05$ vs. Control STD; † $p < 0.05$ vs. BATIRKO STD; ‡ $p < 0.05$ vs. Control HFD; § $p < 0.05$ vs. BATIRKO HFD H.

Además, en otros tejidos periféricos como el hígado, el corazón y el músculo esquelético, los resultados obtenidos corroboraron que la acumulación de lípidos dependía del nivel de expresión de UCP-2 en el hígado y corazón y de UCP-3 en el músculo esquelético (Figura 43A, B y C). De hecho, se encontró una correlación negativa y significativa entre la expresión del ARNm de UCP-2 en corazón, hígado y arteria aorta y el contenido lipídico en dichos tejidos (Figura 44).

A



B



C

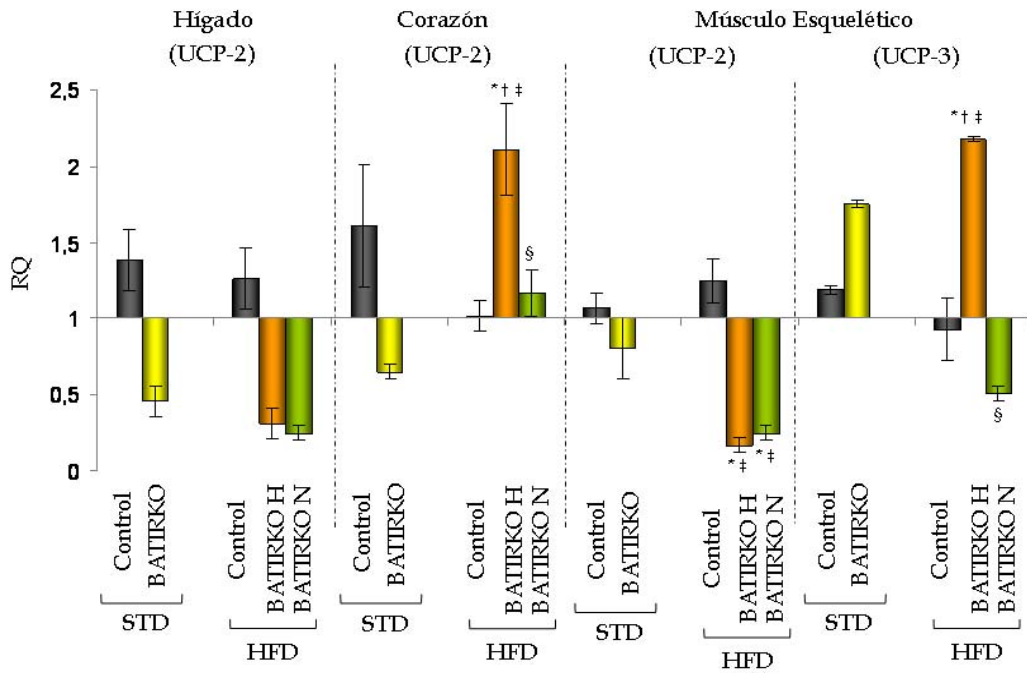


Figura 43. Papel de UCPs en la acumulación lipídica de tejidos periféricos A) Fotografías de cortes de hígado, corazón y músculo esquelético teñidos con OilRedO de los cinco grupos de animales estudiados. B) Cuantificación del contenido lipídico en hígado, corazón y músculo. C) Análisis por RT-PCR cuantitativa a tiempo real del ARNm de UCP-2 en hígado, corazón y músculo y de UCP-3 en el último tejido de los animales control y BATIRKO. * $p < 0.05$ vs. Control STD; † $p < 0.05$ vs. BATIRKO STD; ‡ $p < 0.05$ vs. Control HFD; § $p < 0.05$ vs. BATIRKO HFD H.

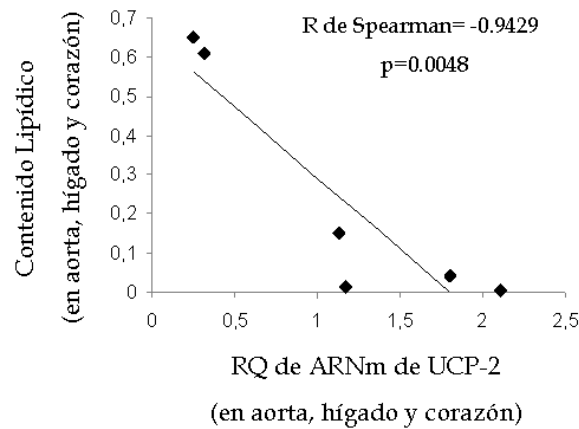


Figura 44. Correlación entre la expresión del ARNm de UCP-2 en corazón, hígado y arteria aorta y el contenido lipídico en dichos tejidos.

Uno de los mecanismos que nos planteamos que podría estar implicado en los distintos niveles de expresión de UCPs en ambas poblaciones de BATIRKO obesos es la expresión diferencial de TNF- α por ambos tejidos adiposos así como los diferentes niveles circulantes de esta citoquina proinflamatoria en ambos grupos. Así, previamente se ha descrito que el TNF- α podría directamente regular a la baja la expresión de UCP-2 en adipocitos blancos [Merial y col., 2000]. En nuestro modelo, los ratones BATIRKO normoinsulinémicos tuvieron niveles elevados de TNF- α en plasma y en la arteria aorta, mientras que mostraron niveles bajos de UCP-2 en la arteria aorta. Por otro lado, el grupo obeso con hiperinsulinemia presentó bajos niveles de TNF- α tanto en el plasma como en la aorta. Así, se observó una correlación significativa e inversa entre los niveles de expresión del ARNm de TNF- α y de UCP-2 en la arteria aorta de ambos grupos de BATIRKO obesos (Figura 45).

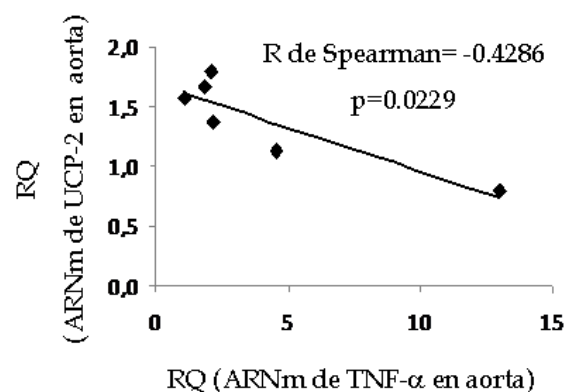


Figura 45. Correlación de los niveles de expresión del ARNm de TNF- α y de UCP-2 en la arteria aorta (A) y en el corazón (B) de ambos grupos de BATIRKO obesos.

Para estudiar si el TNF- α estaba implicado en el descenso de UCP-2 en la aorta, se realizaron experimentos *in vitro* en células de músculo liso vascular (Figura 46). El ácido oleico indujo la expresión de UCP-2 de una forma tiempo-dependiente, mientras que el TNF- α provocó un descenso de la proteína desacoplante 2. Cuando se realizó un pretratamiento con esta citoquina proinflamatoria y una posterior estimulación con el ácido oleico, se observó que el TNF- α redujo significativamente la expresión del ARNm de UCP-2 inducida por el ácido oleico (Figura 46).

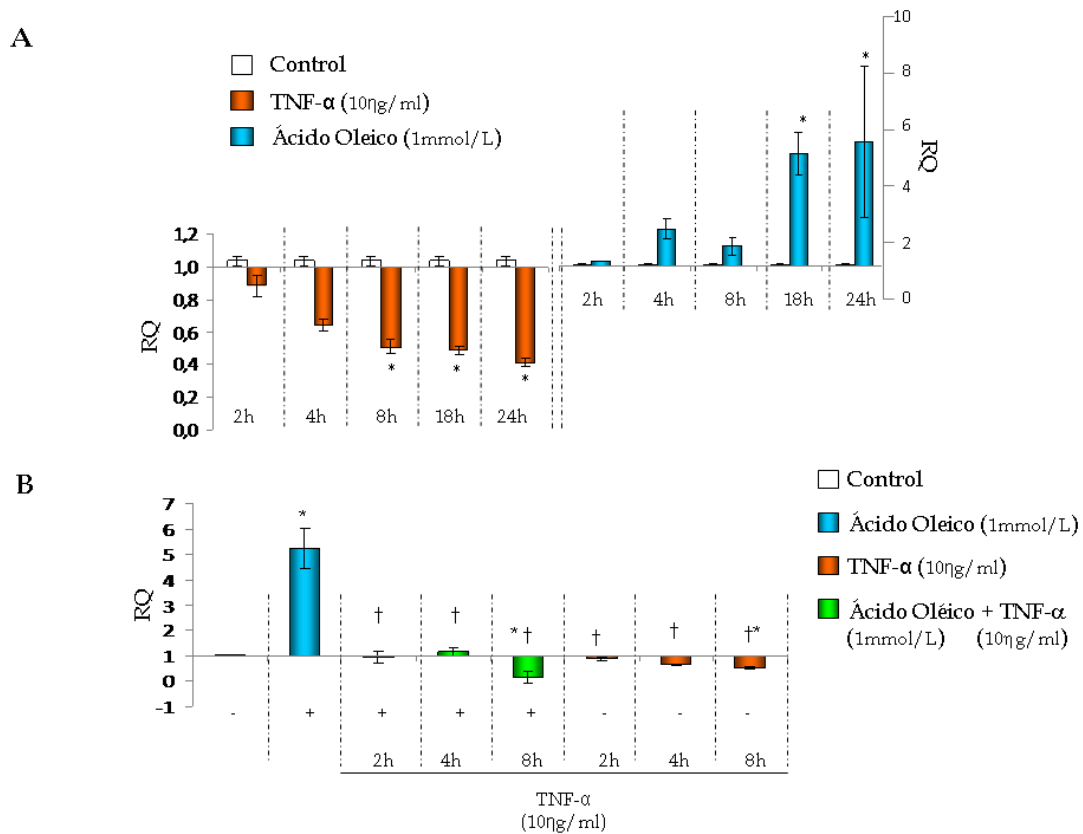


Figura 46. Efecto del TNF- α en la expresión del ARNm de UCP-2 en células vasculares. Efecto del TNF- α (10ng/mL) o del ácido oleico (1mmol/L) en la expresión del ARNm de UCP-2 en CMLV (A) a diferentes tiempos (desde 2 a 24 horas). Efecto del pretratamiento de TNF- α a 2, 4 y 8h en la expresión del ARNm de UCP-2 en CMLV (B) estimuladas con ácido oleico durante 18h. *p<0.05 vs. control; †p<0.05 vs. ácido oleico.

Otro mecanismo que potencialmente podría estar implicado en el daño vascular diferencial observado en los dos grupos de BATIRKO obesos, podría estar relacionado con las especies reactivas de oxígeno (ROS). Observamos, un aumento del anión superóxido y de la cantidad de nitrotirosina en los arcos aórticos del grupo BATIRKO obeso normoinsulinémico comparado con el hiperinsulinémico (Figura 47A, B, C y D). Además, NOX-4, que es la principal isoforma de la NADPH oxidasa implicada en la producción de las ROS en la pared aórtica, sufrió un incremento significativo en la expresión de su ARNm en la aorta de los BATIRKO obesos normoinsulinémicos comparado con los controles (Figura 47E).

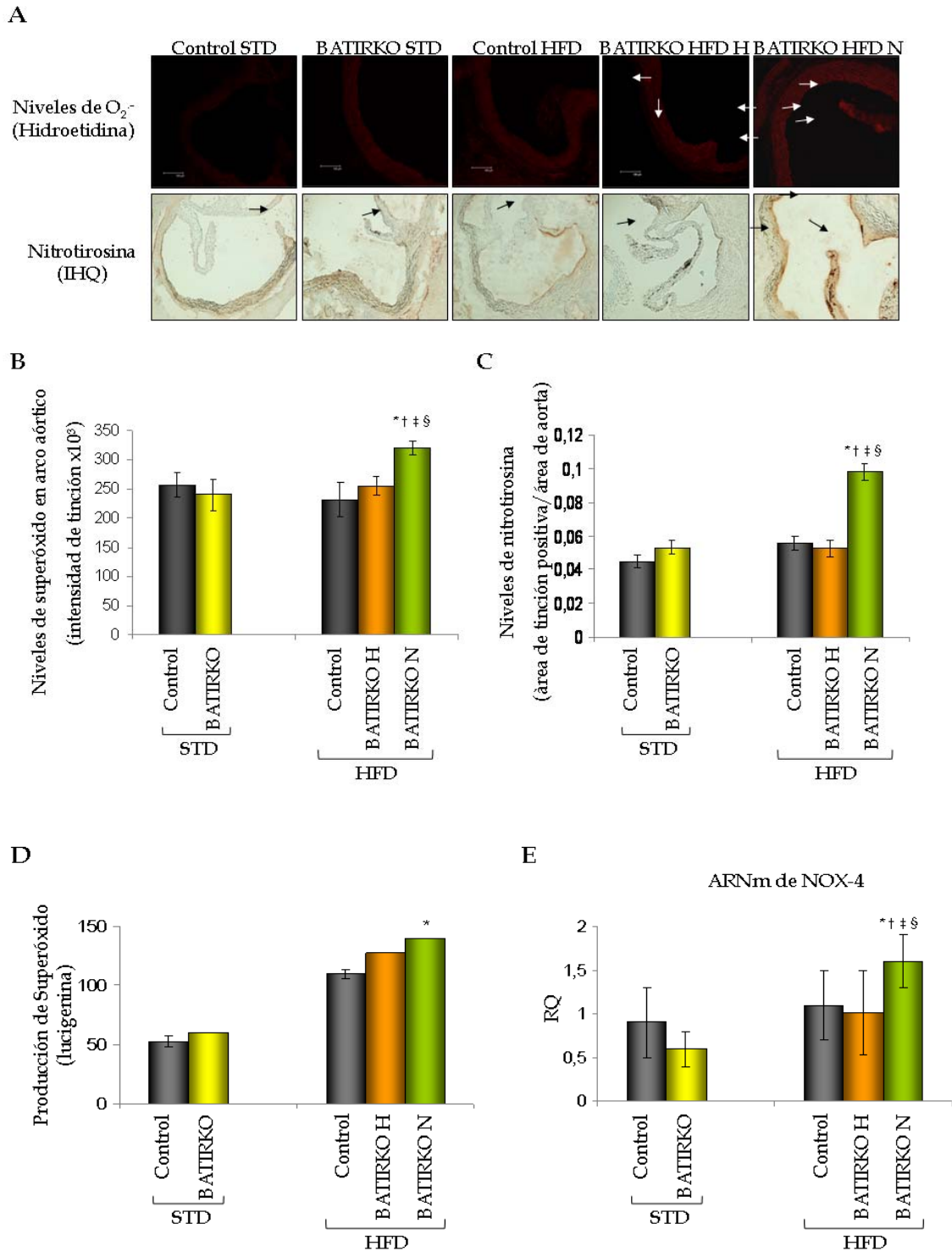


Figura 47. Papel de ROS en el daño vascular de los ratones control y BATIRKO. A) Fotografías representativas de la detección *in situ* de los niveles del anión superóxido por el método de hidroetidina (paneles superiores) y de los niveles de nitro-tirosina mediante inmunohistoquímica (paneles inferiores) en los arcos aórticos de ratones control y BATIRKO. Cuantificación de los niveles de anión superóxido (B) y de los de nitro-tirosina (C) en los arcos aórticos de los grupos estudiados. D) Análisis cuantitativo de la producción del anión superóxido por el método quimioluminescente por lucigenina en los arcos aórticos de ratones control y BATIRKO. E) Expresión del ARNm de NOX-4 mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real en la arteria aorta de ratones control y BATIRKO. *p<0.05 vs. Control STD; †p<0.05 vs. BATIRKO STD; ‡p<0.05 vs. Control HFD; §p<0.05 vs. BATIRKO HFD H.

2. PAPEL DEL TEJIDO ADIPOSO MARRÓN ASOCIADO AL ENVEJECIMIENTO EN EL DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD VASCULAR

2.1. CARACTERIZACIÓN DEL MODELO BATIRKO DE 52 SEMANAS DE EDAD

En primer lugar, se caracterizó el modelo, midiendo distintos parámetros como el peso corporal, los ratios de los tejidos adiposos (WAT y BAT) respecto al peso corporal y las concentraciones plasmáticas de insulina y glucosa. Además, se analizaron parámetros relacionados con la obesidad y la inflamación asociada a ella (Tabla 10).

Se compararon los ratones BATIRKO con sus controles y observamos, como ya sabíamos, que los BATIRKO presentaban una lipoatrofia marrón severa a cualquier edad, es decir, se produjo una pérdida de la masa de dicho tejido, característica propia del genotipo del modelo. Este hecho parece conferir susceptibilidad a la obesidad, idea confirmada por la ganancia de peso y el aumento estadísticamente significativo de la masa de tejido adiposo blanco que observamos en los animales BATIRKO de 52 semanas de edad o envejecidos, respecto a los otros grupos estudiados. Otro parámetro que apoyó la aparición de obesidad en este grupo, fue el aumento estadísticamente significativo de la concentración de leptina en plasma, que se produjo en los BATIRKO de 52 semanas comparado con los otros grupos.

	Control 33 semanas	BATIRKO 33semanas	Control 52 semanas	BATIRKO 52 semanas
Peso (g)	28.9 ± 0.7	27.9 ± 1	31.68 ± 0.8 *†	32.88 ± 0.5 *†
WAT (mg)/ peso (g)	15.5 ± 1.5	21.0 ± 3.5	20.89 ± 2.6	40.41 ± 1.6 *‡
BAT (mg)/ peso (g)	2.39 ± 0.2	0.86 ± 0.07*‡	3.01 ± 0.3	0.88 ± 0.02 *‡
Insulina (ng/ml)	0.37 ± 0.08	0.18 ± 0.02	1.86 ± 0.8 *†	0.71 ± 0.3 †
Glucosa (mg/dl)	120.7 ± 5.9	125.4 ± 7.8	118.8 ± 3.6	145.9 ± 3.9 ‡
TNF-α (pg/ml)	6.4 ± 1.3	6.3 ± 1	12.36 ± 4.5	20.4 ± 13.1 *‡
Leptina (ng/ml)	2.8 ± 0.3	3.8 ± 0.6	3.3 ± 0.8	7.7 ± 1.3 *‡

Tabla 10. Caracterización del modelo BATIRKO envejecido. *p<0.05 vs. Control 33 semanas; †p<0.05 vs. BATIRKO 33 semanas; ‡p<0.05 vs. Control 52 semanas.

Además, el grupo BATIRKO a las 52 semanas presentó mayor intolerancia a la glucosa respecto a los animales del mismo genotipo pero de 33 semanas de edad (Figura 48A). Sin embargo, ninguno de los animales, independientemente de su genotipo, mostró resistencia a la insulina global (Figura 48B). El hecho de que los test de tolerancia a la insulina fueran normales, mientras que la respuesta a una sobrecarga de glucosa (GTT) estaba alterada, nos sugería que el defecto observado en la homeostasis de la glucosa se debía a una secreción de insulina alterada, más que a una acción anómala de la hormona. Así, que para conocer más a fondo este suceso, llevamos a cabo los tests de secreción aguda de insulina y observamos que se producía un fallo severo en la secreción de dicha hormona en los animales BATIRKO tanto a las 33 como a las 52 semanas de edad (Figura 48C). Ya hemos explicado anteriormente, que el genotipo BATIRKO de 33 semanas de edad mostró hipoinsulinemia y un ligero descenso del tamaño del islote pancreático, al compararlo con los ratones control (Tabla 10 y Figura 49A). Comprobamos que esta circunstancia se mantenía en los animales de edad avanzada. Como se puede observar en la tabla 10, el animal BATIRKO a las 52 semanas de edad, mostró una concentración plasmática de insulina menor que los animales control de la misma edad. Sin embargo, mostró un aumento estadísticamente significativo comparado con los ratones BATIRKO adultos, aumento que se puede atribuir al propio envejecimiento de los animales, ya que ocurrió lo mismo en los controles. Es más, el ratón BATIRKO de 52 semanas de edad, presentó una moderada hiperglucemia en el ayuno pero estadísticamente significativa comparada con la de los animales control de la misma edad (Tabla 10). Por tanto, el hecho de que estos animales presentaran intolerancia a la glucosa pero sin resistencia a la insulina, era debido a un fallo severo en la secreción aguda de la hormona.

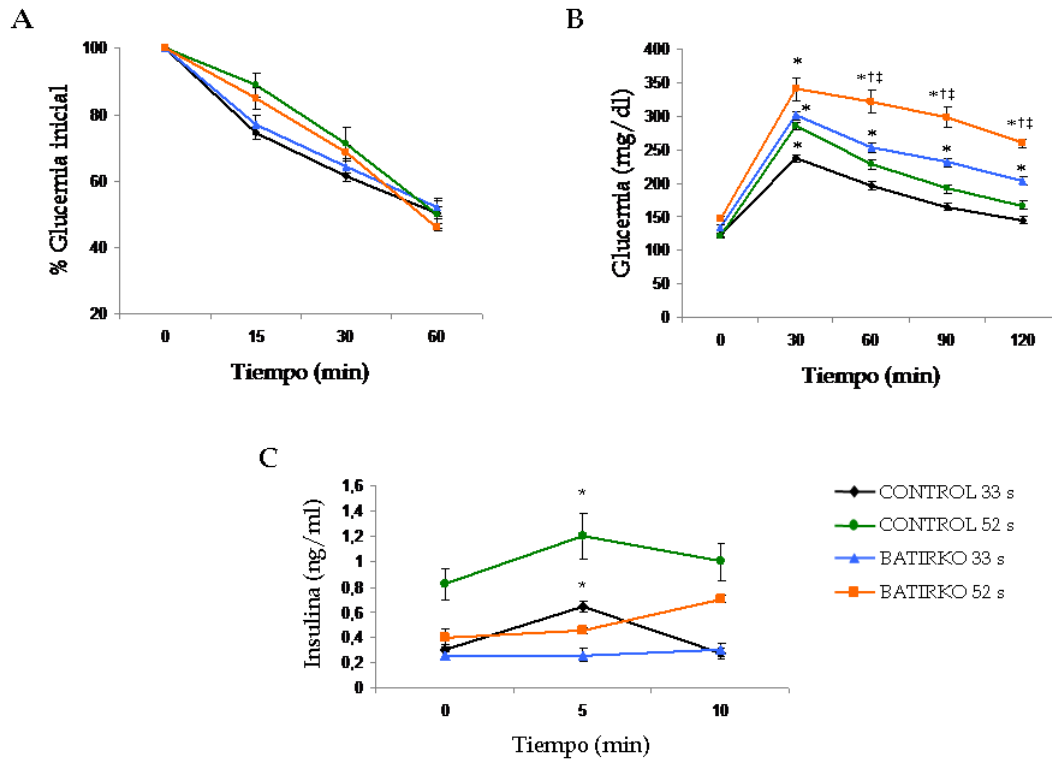


Figura 48. Estudio del metabolismo de la glucosa en los ratones control y BATIRKO de 33 y 52 semanas de edad. **A)** Test de tolerancia a la insulina en los 4 grupos estudiados. **B)** Test de tolerancia a la glucosa de los ratones control y BATIRKO a las 2 edades estudiadas. **C)** Test de secreción aguda de insulina en todos los grupos estudiados. * $p < 0.05$ vs. Control 33 semanas; † $p < 0.05$ vs. BATIRKO 33 semanas; ‡ $p < 0.05$ vs. Control 52 semanas.

Previamente se ha descrito que la sobre-expresión de la proteína UCP-2 en las células β pancreáticas se asocia con un descenso de la secreción de insulina [Chan y col., 1999]. A este respecto, mediante técnicas de inmunohistoquímica, confirmamos que los ratones BATIRKO y principalmente el ratón BATIRKO envejecido, mostraban un aumento estadísticamente significativo en la expresión de UCP-2 en el islote pancreático (Figura 49A). Al mismo tiempo, observamos un aumento estadísticamente significativo de UCP-1 (tanto a nivel del ARNm como de proteínas) en los ratones BATIRKO de 52 semanas de edad, comparado con el resto de los grupos estudiados (Figura 49B).

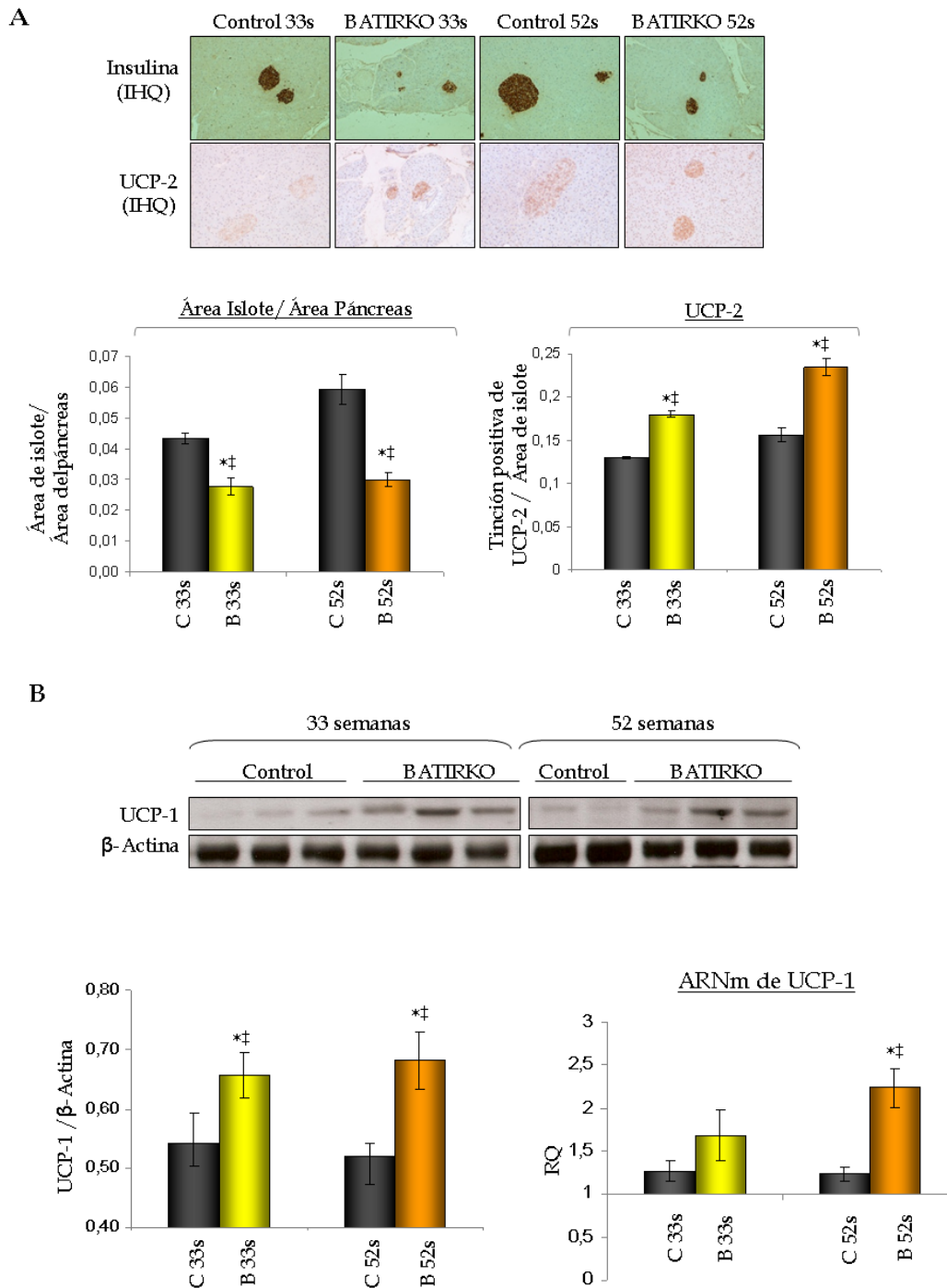


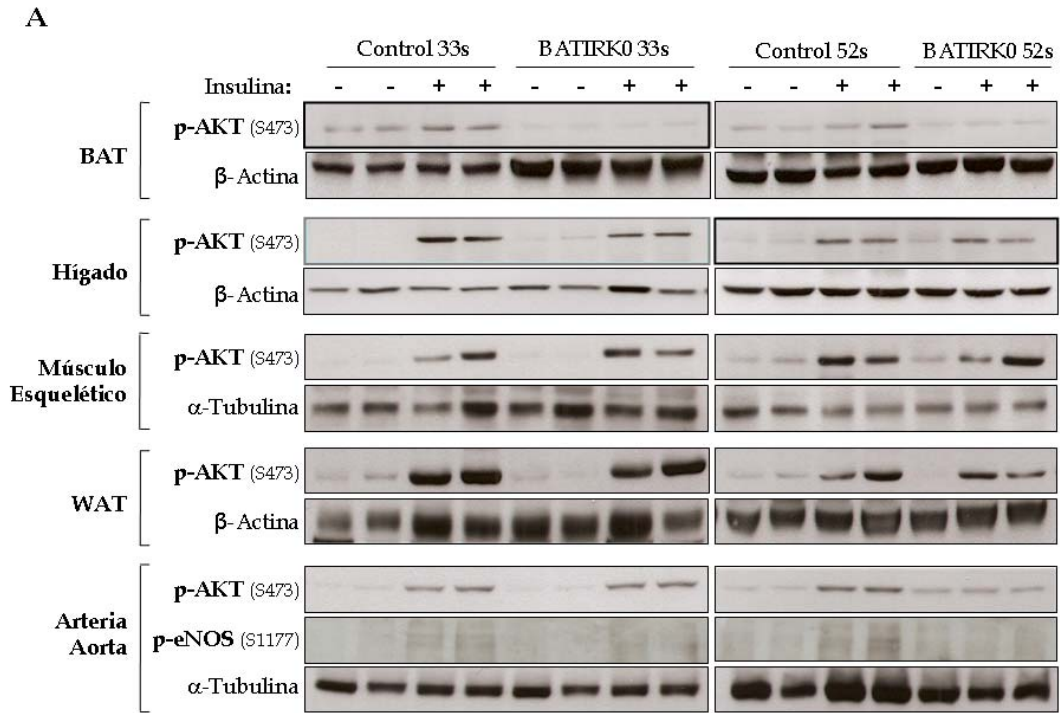
Figura 49. Estudio del páncreas y del tejido adiposo marrón en los ratones sometidos a estudio. **A)** IHQ de Insulina y UCP-2 en el páncreas (paneles superiores) de los 4 grupos estudiados. En el panel inferior, cuantificación del contenido de insulina y de la tinción positiva de UCP-2 por área de páncreas (gráficas izquierda y derecha, respectivamente). **B)** Estudio por Western blot de la expresión de UCP-1 en el tejido adiposo marrón de los ratones control y BATIRKO de 33 y 52 semanas de edad (paneles superiores). En la parte inferior de este apartado se puede observar la cuantificación de dicha proteína respecto al normalizador β-actina, así como la expresión del ARNm de UCP-1 en el tejido adiposo marrón (gráficas izquierda y derecha, respectivamente). * $p < 0.05$ vs. Control 33 semanas; † $p < 0.05$ vs. BATIRKO 33 semanas; ‡ $p < 0.05$ vs. Control 52 semanas.

2.2. RESISTENCIA VASCULAR A LA ACCIÓN DE LA INSULINA INDUCIDA POR CITOADIPOQUINAS PRODUCIDAS POR EL BAT Y EL WAT EN EL RATÓN BATIRKO DE 52 SEMANAS DE EDAD

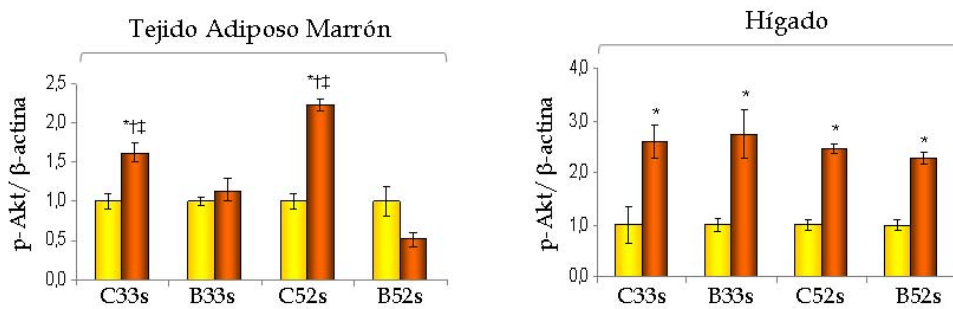
El ratón BATIRKO, como su propio nombre indica, carece del receptor de la insulina (IR) en el tejido adiposo marrón (BAT). Como consecuencia, en dicho tejido se produce un fallo en la señalización de la insulina, como comprobamos al realizar un Western blot (Figura 50) de la fosforilación en el residuo serina 473 de la proteína Akt; dicha proteína es una de las principales quinasas implicadas en la señalización de la insulina.

Para analizar si esta resistencia primaria en el BAT iba asociada a una resistencia a la insulina secundaria en tejidos periféricos, realizamos Western blot con el anticuerpo contra el mismo residuo fosforilado de Akt que habíamos estudiado en BAT, en distintos tejidos diana de dicha hormona, como son el tejido adiposo blanco, el hígado, el músculo esquelético y la arteria aorta, tanto en ratones control como en ratones BATIRKO. Observamos, que la señalización de la insulina en el hígado y el músculo esquelético no se encuentra alterada en ninguno de los grupos estudiados, como consecuencia de esa resistencia primaria observada en el BAT (Figura 50A, B y C). Este hecho podría explicar por qué ambos grupos de ratones BATIRKO, tanto el adulto como el envejecido, no presentan resistencia a la insulina global.

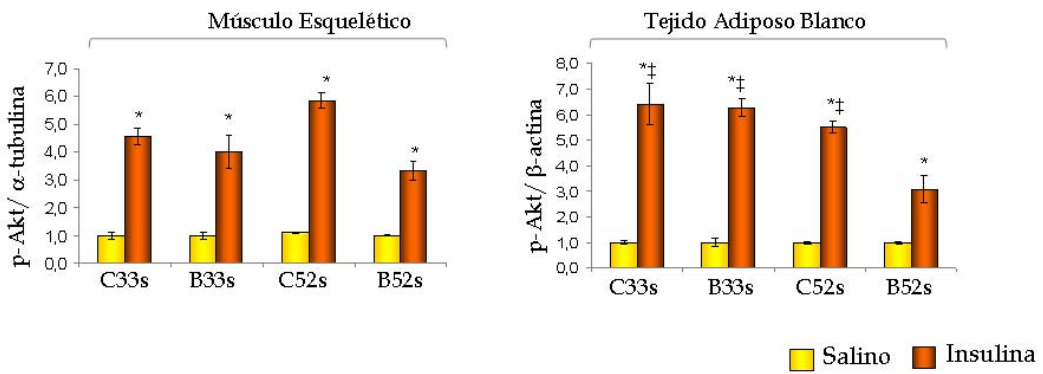
Sin embargo, el grupo BATIRKO envejecido, que hemos señalado que sufría obesidad, mostró un descenso estadísticamente significativo de la señalización de la insulina en el tejido adiposo blanco (Figura 50A y C). Además, observamos que el BATIRKO de 52 semanas de edad, presentaba resistencia vascular a la acción de la insulina, ya que no mostraba respuesta en la fosforilación de Akt frente al estímulo hormonal, de la misma forma que tampoco se observaba respuesta en la fosforilación del residuo Serina 1177 de eNOS, residuo fosforilado por la acción de Akt (Figura 50A y D). Así, debido al desarrollo de un proceso de obesidad la resistencia primaria en el BAT iba asociada a un descenso en la señalización de insulina en el WAT en los ratones BATIRKO de 52 semanas, para finalmente causar una resistencia a la insulina en la arteria aorta.



B



C



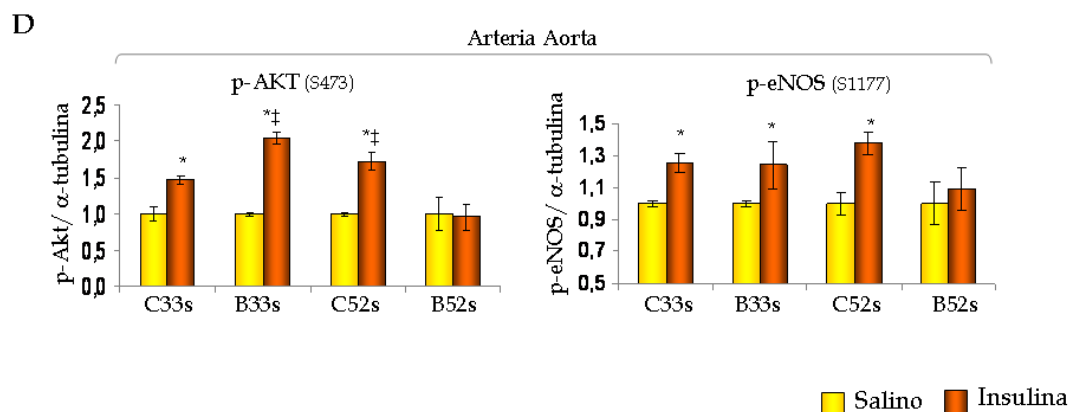


Figura 50. Señalización *in vivo* de la insulina en ratones control y BATIRKO a las 33 y 52 semanas de edad. **A)** Estudio por Western blot de la fosforilación de proteínas inducida por insulina en el tejido adiposo marrón, hígado, músculo esquelético, tejido adiposo blanco y arteria aorta de los ratones control y BATIRKO jóvenes y envejecidos. **B)** Cuantificación de dicha fosforilación respecto a β -actina en tejido adiposo marrón e hígado. **C)** Cuantificación de la fosforilación de Akt en respuesta a insulina en el músculo esquelético y el tejido adiposo blanco respecto al normalizador (α -tubulina y β -actina respectivamente). **D)** Cuantificación de la Ser473 de Akt y de la Ser1177 de eNOS en la arteria aorta en respuesta al estímulo de insulina, respecto a α -tubulina en los ratones de ambos genotipos jóvenes y envejecidos. * $p < 0.05$ vs. tratamiento con salino; † $p < 0.05$ vs. BATIRKO 33s con insulina; *† $p < 0.05$ vs. BATIRKO 52s con insulina.

Para conocer el mecanismo implicado en la resistencia a la insulina vascular causada como consecuencia de los efectos conjuntos de la resistencia a la hormona en el BAT y la obesidad, estudiamos la producción de citoadipoquinas que tenía lugar tanto en el tejido adiposo marrón, fuente de la resistencia primaria, como en el tejido adiposo blanco, causante de la obesidad. Observamos que la expresión del ARNm y de proteína de TNF- α , leptina y PAI-1 sufría un aumento estadísticamente significativo en ambos tejidos en el animal BATIRKO de 52 semanas de edad comparado con el resto de grupos estudiados (Figura 51). Además, este aumento de expresión de TNF- α y leptina locales en los tejidos, se relacionaba con el aumento de las concentraciones plasmáticas de estas citoadipoquinas, en el ratón BATIRKO envejecido (Tabla 10).

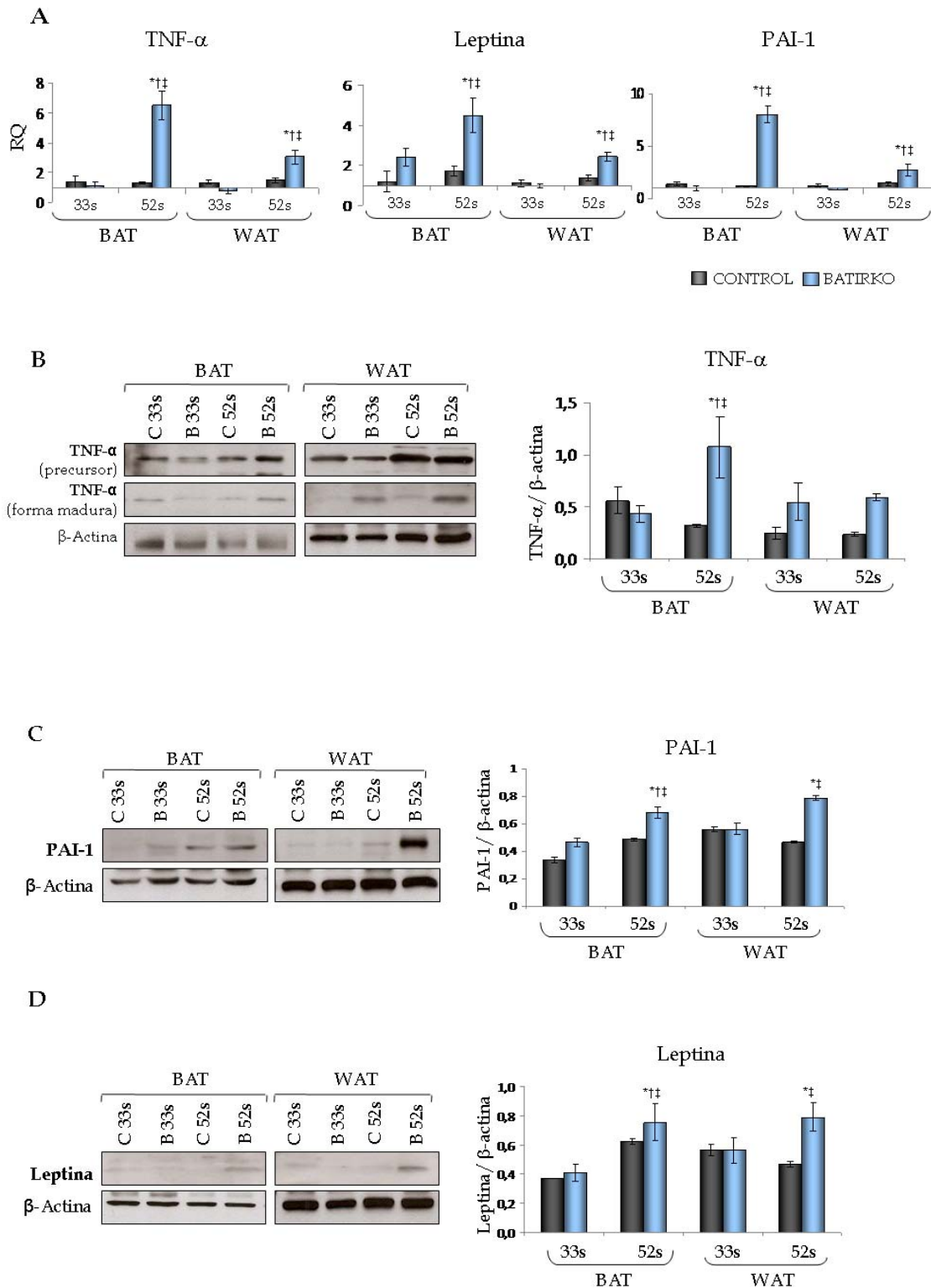


Figura 51. Estudio de las citoquinas y adipocinas inflamatorias producidas por los tejidos adiposos blanco y marrón en los ratones control y BATIRKO de 33 y 52 semanas de edad. **A)** Expresión del ARNm de TNF- α , leptina y PAI-1 en ambos tejidos adiposos. Estudio por Western blot de la expresión proteica de TNF- α (**B**), PAI-1 (**C**) y leptina (**D**) en los 4 grupos estudiados. A la izquierda se pueden observar los geles representativos y a la derecha las cuantificaciones de la expresión de proteínas respecto a la proteína normalizadora β -actina en los todos los grupos estudiados. * $p < 0.05$ vs. Control 33 semanas; † $p < 0.05$ vs. BATIRKO 33 semanas; ‡ $p < 0.05$ vs. Control 52 semanas.

2.3. EL RATÓN BATIRKO DE 52 SEMANAS DE EDAD SUFRE DISFUNCIÓN VASCULAR E INFLAMACIÓN LOCAL EN LA ARTERIA AORTA

Ya habíamos observado que el animal BATIRKO presentaba resistencia primaria a la acción de la insulina en el tejido adiposo marrón, y que a medida que envejecía desarrollaba obesidad y mostraba un descenso en la señalización de insulina en el WAT, para finalmente sufrir una resistencia vascular a la acción de la insulina. Para estudiar si esta situación metabólica provocaba alteraciones vasculares, más allá de la resistencia a la insulina observada, analizamos la función vascular en anillos de la arteria aorta de animales control y BATIRKO.

El primer paso fue estudiar la función endotelial. Para ello, examinamos la respuesta de los anillos aórticos frente a la acetilcolina (ACh), que, como ya hemos apuntado, produce una relajación dependiente de endotelio. Así, observamos que los ratones BATIRKO de 52 semanas de edad tenían un descenso estadísticamente significativo de la respuesta relajante inducida por la ACh (Figura 52A).

Al mismo tiempo, mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real, estudiamos la expresión de distintos genes implicados en el daño vascular. Y comprobamos que, en los animales BATIRKO de mayor edad, se producía un aumento significativo de genes relacionados con la activación endotelial, como endotelina 1 (ET-1), y una molécula de adhesión como ICAM-1 (Figura 52B y C, respectivamente). Además, observamos un incremento significativo de la expresión del ARNm de eNOS en la arteria aorta de ratones BATIRKO envejecidos, probablemente como un mecanismo compensatorio frente al daño endotelial (Figura 52D).

El descenso de la respuesta a ACh y la alteración en la expresión de los genes estudiados, sugerían que los ratones BATIRKO de 52 semanas de edad presentaban disfunción endotelial.

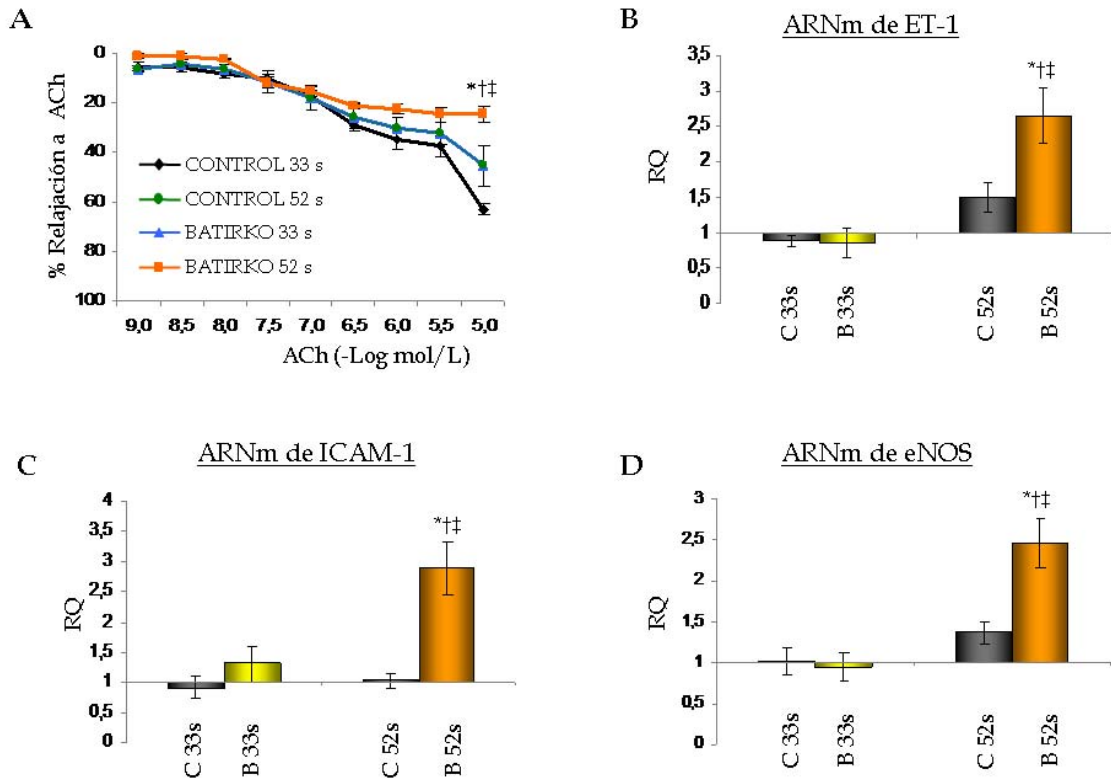


Figura 52. Estudio de la función endotelial en los anillos aórticos de ratones control y BATIRKO. A) Relajación dependiente de endotelio en respuesta a Acetilcolina (ACh) en anillos previamente precontraídos con fenilefrina en los 4 grupos estudiados. Estudio de la expresión de ARNm de genes implicados en la función endotelial como endotelina-1 (B), ICAM-1 (C) y eNOS (D) mediante PCR cuantitativa a tiempo real. *p<0.05 vs. Control 33 semanas; †p<0.05 vs. BATIRKO 33 semanas; ‡p<0.05 vs. Control 52 semanas.

Por el contrario, cuando estudiamos la respuesta en los anillos aórticos de los animales frente a nitroprusiato sódico (SNP) (que causa una relajación independiente de endotelio) no encontramos diferencias significativas entre ninguno de los grupos (Figura 53).

También evaluamos la vasoconstricción en respuesta a AngII en los cuatro grupos estudiados y observamos que se producía un aumento significativo en la respuesta contráctil del grupo BATIRKO de 52 semanas comparado con el grupo control (Figura 54). Sumando este resultado a la disfunción endotelial previamente hallada, sólo el grupo BATIRKO de mayor edad presentaba disfunción vascular.

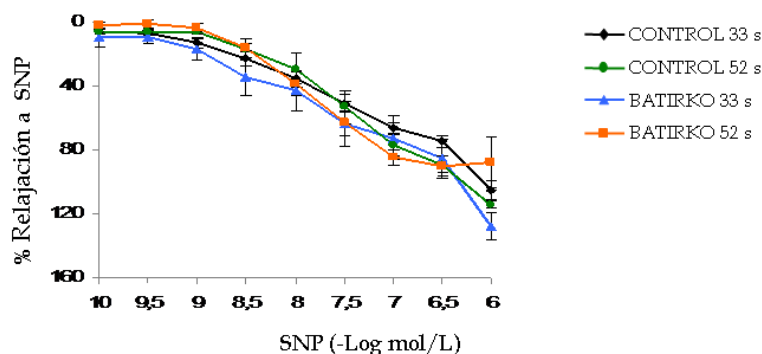


Figura 53. Relajación independiente de endotelio en la arteria aorta de ratones control y BATIRKO. Relajación inducida por SNP en los anillos aórticos precontraídos con fenilefrina de los 4 grupos estudiados. * $p < 0.05$ vs. Control 33 semanas; † $p < 0.05$ vs. BATIRKO 33 semanas; ‡ $p < 0.05$ vs. Control 52 semanas.

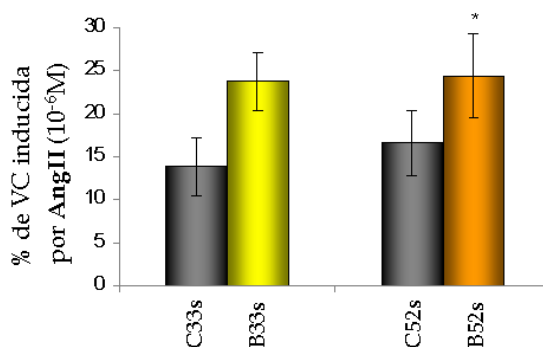


Figura 54. Respuesta vasoconstrictora frente a Angiotensina II en la arteria aorta de ratones control y BATIRKO. Se utilizó una dosis única de AngII de 10^{-6} M para inducir la respuesta vasoconstrictora en los anillos aórticos de los grupos estudiados de ratones control y BATIRKO. * $p < 0.05$ vs. Control 33 semanas; † $p < 0.05$ vs. BATIRKO 33 semanas; ‡ $p < 0.05$ vs. Control 52 semanas.

Por otro lado, la insulina tiene una acción dual en el vaso; el efecto vasodilatador lo ejerce a través de la ruta Akt/eNOS, aumentando la producción de NO. El efecto vasoconstrictor se debe a una estimulación de la ruta Ras/Raf/MAPK que finaliza en la producción de ET-1. Ya que habíamos observado un descenso en la señalización de insulina en la arteria aorta que afectaba a Akt y eNOS (Figura 50A y D), quisimos estudiar la relajación inducida por dicha hormona, en anillos aórticos previamente

contraídos con fenilefrina. De esta forma, observamos que el ratón BATIRKO a las 52 semanas de edad presentaba un descenso estadísticamente significativo de la relajación en respuesta a la insulina, comparado con los controles (Figura 55). Por lo tanto, el descenso de la señalización de insulina en aorta, junto con una menor respuesta de relajación frente a la misma hormona, sugirió que el ratón BATIRKO de 52 semanas de edad sufría resistencia vascular a la acción de la insulina.

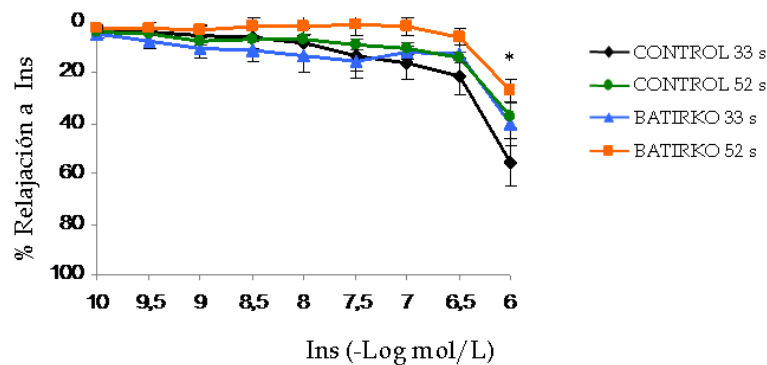


Figura 55. Relajación en respuesta a insulina en los anillos aórticos de ratones control y BATIRKO. Respuesta de relajación inducida a dosis creciente de insulina en anillos aórticos de los ratones control y BATIRKO de 33 y 52 semanas de edad, precontraídos con PE. * $p < 0.05$ vs. Control 33 semanas; † $p < 0.05$ vs. BATIRKO 33 semanas; ‡ $p < 0.05$ vs. Control 52 semanas.

Mediante inmunohistoquímica, pudimos observar un aumento estadísticamente significativo del infiltrado de macrófagos en los arcos aórticos de los ratones BATIRKO de 52 semanas de edad respecto a los otros grupos estudiados (Figura 56A y B). En este sentido, también observamos un aumento estadísticamente significativo de la expresión de MCP-1 en la arteria aorta de los ratones BATIRKO envejecidos respecto al resto de grupos (Figura 56C).

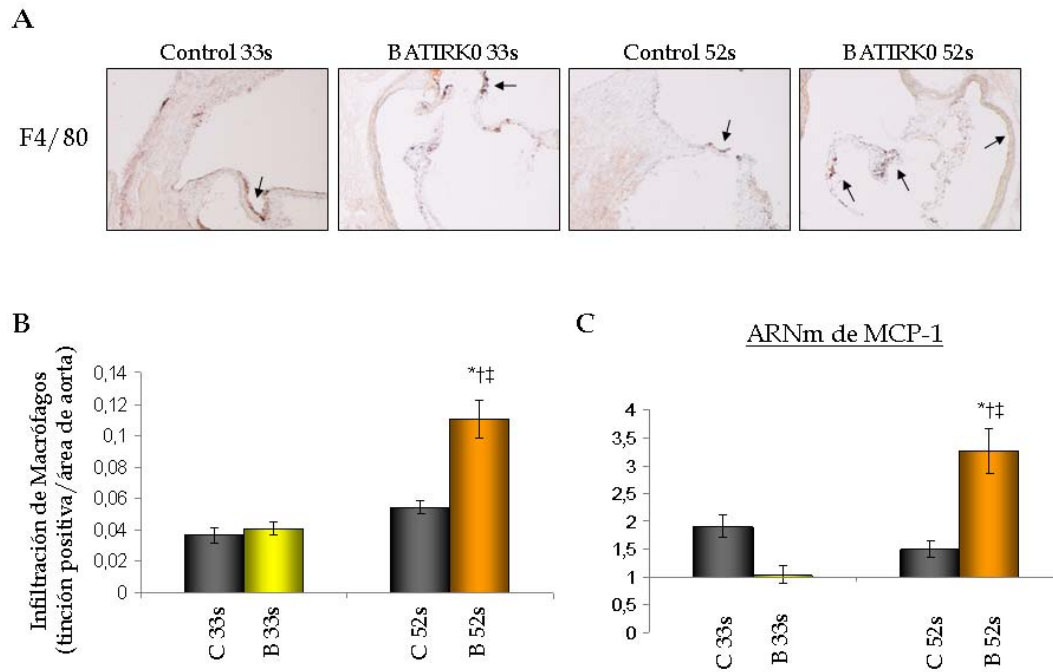


Figura 56. Estudio de la inflamación en la arteria aorta de ratones control y BATIRKO. (A) IHQ de F4/80, que mide la infiltración de macrófagos en el arco aórtico de ratones control y BATIRKO a las 33 y 52 semanas de edad. **B)** Cuantificación de la IHQ de macrófagos para relacionar la infiltración con el área de la aorta. **C)** Expresión del ARNm de MCP-1 en la arteria aorta de ratones control y BATIRKO. * $p < 0.05$ vs. Control 33 semanas; † $p < 0.05$ vs. BATIRKO 33 semanas; ‡ $p < 0.05$ vs. Control 52 semanas.

Además, mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real, estudiamos la expresión de ARNm de genes implicados en el proceso inflamatorio en la arteria aorta, como iNOS, TNF- α y sus receptores y PAI-1, encontrando un aumento significativo en todos ellos en el ratón BATIRKO de 52 semanas respecto a su control y los grupos de ratones de 33 semanas de edad (Figura 57).

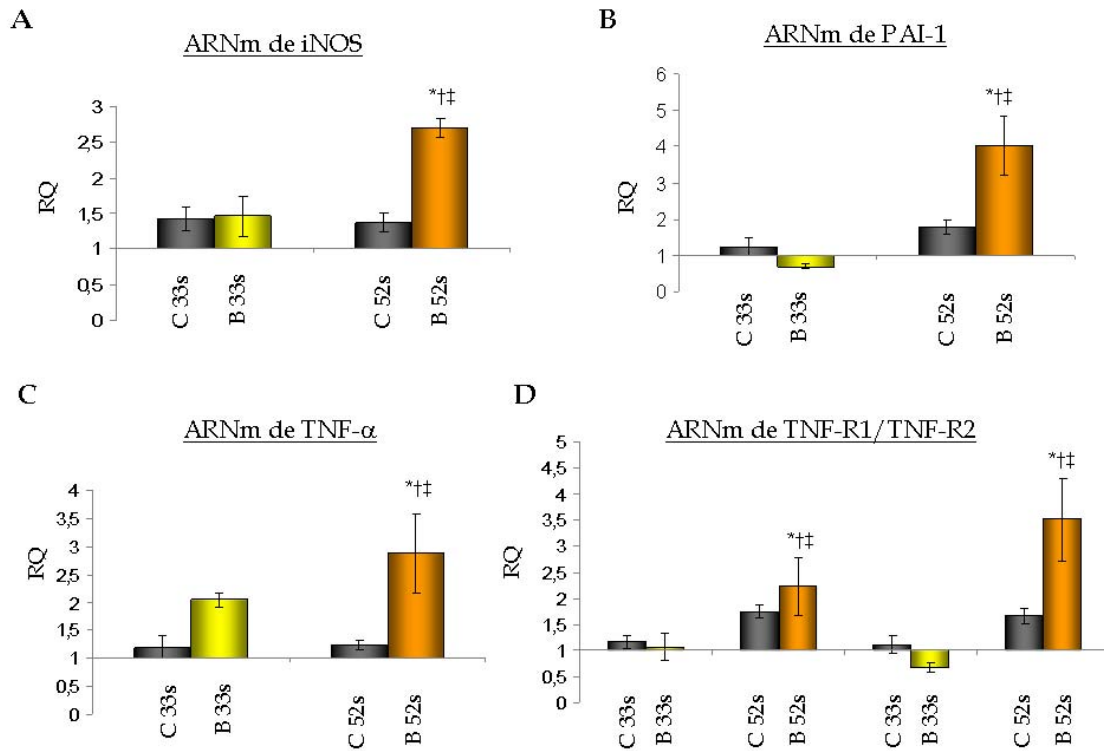


Figura 57. Expresión del ARNm de genes proinflamatorios en la arteria aorta de ratones control y BATIRKO. Mediante qRT-PCR analizamos la expresión del ARNm de iNOS (A), PAI-1 (B), TNF- α (C) y TNFRs (D). * $p < 0.05$ vs. Control 33 semanas; † $p < 0.05$ vs. BATIRKO 33 semanas; ‡ $p < 0.05$ vs. Control 52 semanas.

2.4. FUNCIÓN DE ROS Y ENZIMAS ANTIOXIDANTES EN LA DISFUNCIÓN VASCULAR OBSERVADA EN EL RATÓN BATIRKO DE 52 SEMANAS DE EDAD

Otro de los mecanismos potencialmente implicado en la disfunción vascular que tiene lugar en el ratón BATIRKO envejecido, podría estar relacionado con las especies reactivas de oxígeno o ROS. Así, observamos un aumento estadísticamente significativo tanto de los niveles de nitrotirosina como del anión superóxido en los arcos aórticos de estos ratones (Figura 58) comparado con los controles y los BATIRKO de 33 semanas.

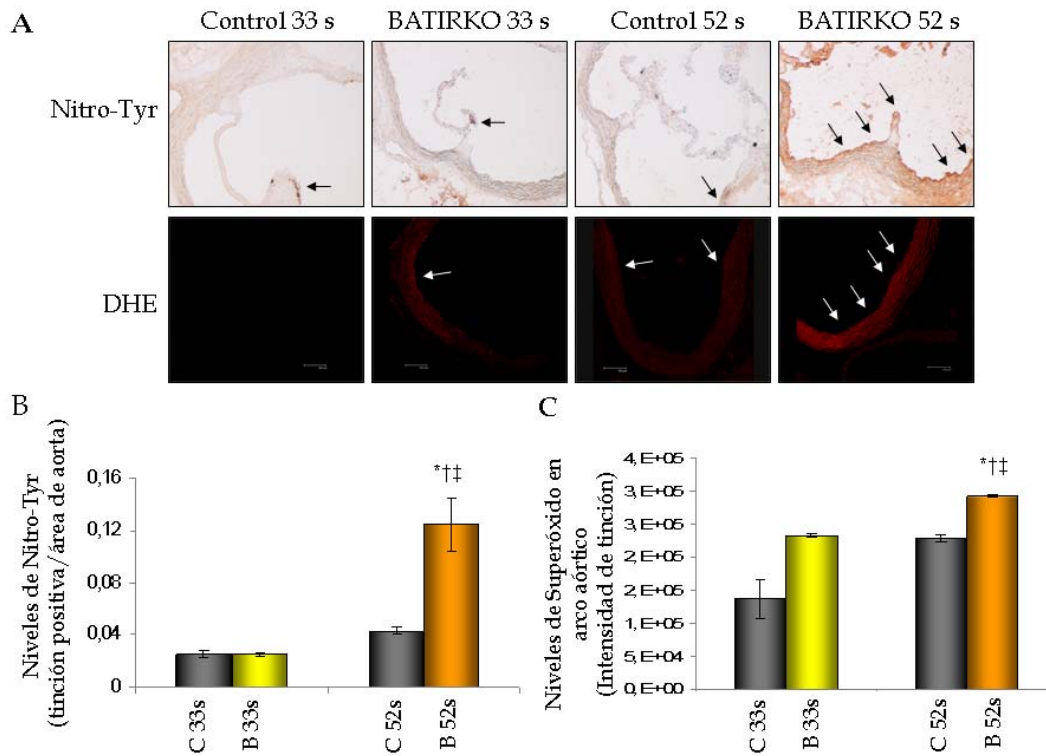


Figura 58. Estudio de las especies reactivas de oxígeno en la arteria aorta de ratones control y BATIRKO jóvenes y sometidos a envejecimiento. **A)** IHQ de nitro-tirosina y detección *in situ* del anión superóxido por dihidroxietidina en el arco aórtico de los cuatro grupos estudiados. **B)** Cuantificación de los niveles de nitro-tirosina respecto al área del tejido. **C)** Cuantificación del anión superóxido generado en la arteria aorta de los ratones estudiados. * $p < 0.05$ vs. Control 33 semanas; † $p < 0.05$ vs. BATIRKO 33 semanas; ‡ $p < 0.05$ vs. Control 52 semanas.

Esta mayor producción de ROS podría deberse a un desequilibrio en la expresión de los enzimas oxidantes y antioxidantes. Se ha descrito que NOX-4 es la principal forma de la NADPH oxidasa y está implicada en la producción de ROS en la pared arterial. Así, observamos un aumento significativo de la expresión de ARNm de NOX-4 en la arteria aorta de BATIRKO a las 52 semanas de edad comparado con el resto de grupos (Figura 59A).

Además, analizamos la expresión del ARNm de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa 2 (SOD-2), la catalasa y la glutatión peroxidasa (Gpx-1 y Gpx-4). Y observamos un descenso en la expresión de SOD-2, Gpx-1 y Gpx-4 en el ratón BATIRKO envejecido (Figura 59B y D).

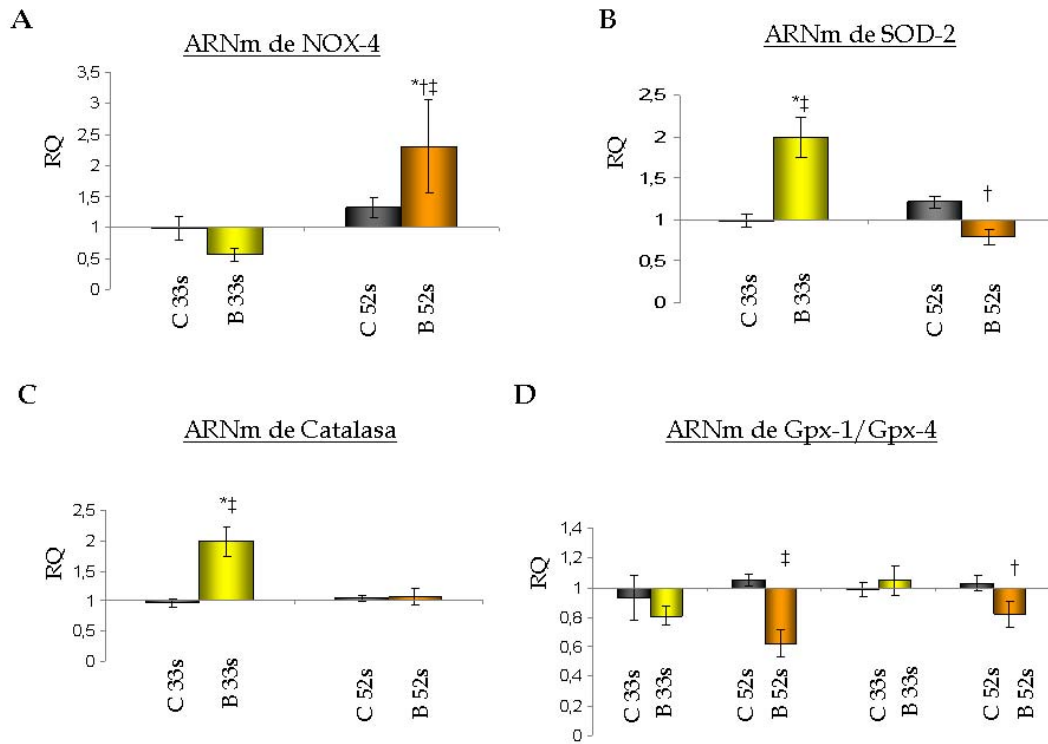


Figura 59. Expresión del ARNm de enzimas antioxidantes y oxidantes en la arteria aorta de control y BATIRKO. Por qRT-PCR analizamos la expresión del ARNm de NOX-4 (A), SOD-2 (B), catalasa (C) y Glutation peroxidasa (Gpx-1 y -4) (D) en la arteria aorta de los cuatro grupos estudiados. * $p < 0.05$ vs. Control 33 semanas; † $p < 0.05$ vs. BATIRKO 33 semanas; ‡ $p < 0.05$ vs. Control 52 semanas.

3. METABOLISMO DE LOS ÁCIDOS GRASOS Y DE LA GLUCOSA EN CULTIVOS CELULARES DE CARDIOMIOCITOS Y CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR

3.1. ESTUDIOS EN CARDIOMIOCITOS

Se obtuvieron las líneas celulares a partir del cultivo primario, tal y como se explicó en el apartado de material y métodos. Para la inmortalización de las líneas, se transfectaron las células con el ADN del Antígeno T, se realizó una selección con puromicina, y posteriormente se comprobó la inmortalización mediante Western blot contra el Antígeno T y contra p53 (Figura 60A). La presencia de ambas proteínas confirma que las células habían sido inmortalizadas.

Para comprobar que las células obtenidas e inmortalizadas eran realmente las células deseadas y que se había eliminado la contaminación por otros tipos celulares, se realizó Western blot con un anticuerpo contra una proteína específica de cardiomiocitos y corazón, como es la Troponina T (TnT) (Figura 60B).

Los cardiomiocitos son células musculares, y por tanto sería esperable que realizaran el transporte de la glucosa al interior celular. Por ello estudiamos la expresión de los transportadores de glucosa GLUT-1 y GLUT-4, el primero como transportador inespecífico y el segundo, representativo del transporte dependiente de insulina. En la Figura 60C, se muestra el Western blot que se realizó contra estos transportadores, comparando los cardiomiocitos obtenidos con otros tipos celulares y con tejidos. Se puede observar que la expresión de Glut- 4 en cardiomiocitos neonatales es inferior a la de otros tipos celulares.

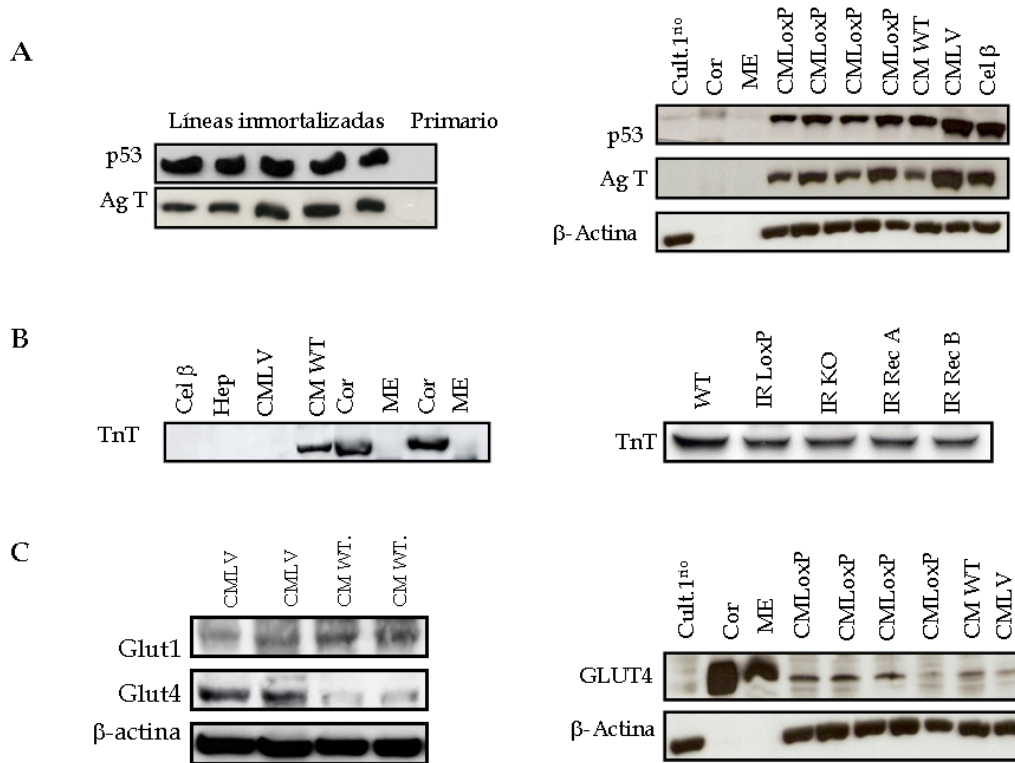


Figura 60. Caracterización de las líneas celulares de cardiomiocitos. **A)** Comprobación de la immortalización mediante Western blot contra el Antígeno T y p53 de los cardiomiocitos WT (izquierda) y de los IRLoxP (derecha). **B)** Estudio de la proteína específica de corazón (Tn T) en todas las líneas obtenidas. **C)** Estudio de la expresión de Glut-4 después de la immortalización en líneas de cardiomiocitos WT e IRLoxP. Cor: corazón; ME: músculo esquelético; Cél β: célula β pancreática; Hep: hepatocito; CMLV: célula de músculo liso vascular.

Después de la obtención de la línea de cardiomiocitos IRLoxP, se procedió a la obtención de las líneas IRKO, Rec A y Rec B. Para ello, lo primero que se hizo fue infectar la línea LoxP con el virus AdenoCRE que permitía eliminar el receptor de insulina flanqueado por las secuencias LoxP. Para comprobar que efectivamente se había obtenido la línea KO se realizó un Western blot contra el receptor de insulina (Figura 61A). A continuación, se realizó una PCR para discriminar si se había reconstituido de forma específica con la isoforma A o con la isoforma B del IR. Se observa en la figura 61B que las líneas celulares CM WT y CM IRLoxP expresaban las dos isoformas del IR, mientras que la línea IR Rec A, sólo presentó la banda de la isoforma A del IR y la línea IR Rec B, sólo la correspondiente a la isoforma B del IR. Finalmente, mediante Western blot comprobamos que las dos líneas celulares, CM IR Rec A e IR Rec B, tenían la banda del IRβ y presentaban niveles comparables de reconstitución (Figura 61C).

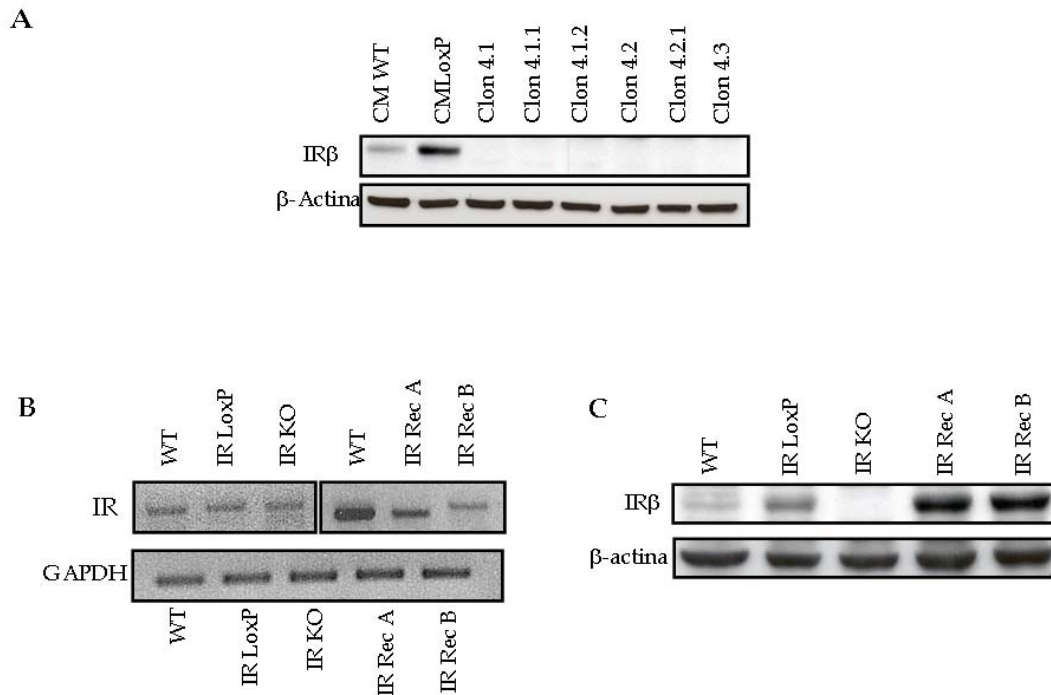


Figura 61. Obtención de las líneas reconstituidas con las isoformas del receptor de insulina. **A)** Estudio por Western blot de la expresión del receptor de insulina en cardiomiocitos WT y LoxP, así como en distintos clones infectados con AdenoCRE. **B)** Estudio por RT-PCR de la reconstitución con las isoformas del IR. GAPDH se utilizó como gen normalizador. **C)** Estudio de la reconstitución de las isoformas del IR mediante Western blot en las cinco líneas celulares obtenidas.

Se realizó una caracterización de la ruta de señalización intracelular de la insulina y se observó que los cardiomiocitos neonatales expresaban muchas de las proteínas implicadas en la ruta de señalización de la insulina (Figura 62). Un dato relevante, es que las líneas reconstituidas con las isoformas del receptor de insulina muestran una mayor expresión de la proteína IRS-2 y un descenso en la expresión de IRS-1, que el resto de las líneas celulares. Este aumento podría deberse a una compensación por la pérdida del receptor y podría estar relacionado con la función metabólica de la insulina. Según se ha descrito en la literatura, IRS-2 representa un importante papel como mediador de las acciones metabólicas de la insulina y en presencia de un análogo de la dicha hormona, este sustrato se activa más en cardiomiocitos [Rother y col., 1998; Rakatzi y col., 2003].

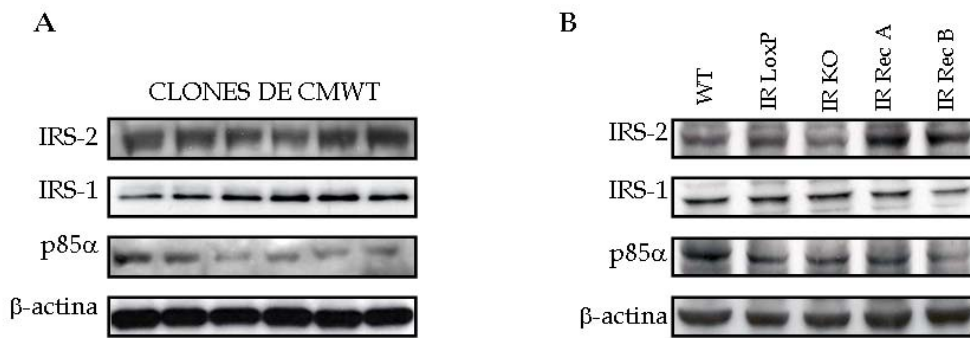


Figura 62. Expresión de la ruta de señalización de la insulina en cardiomiocitos. A) Distintos clones de CMWT. **B)** Líneas celulares WT, con el receptor de insulina flanqueado por secuencias LoxP, carentes del receptor de insulina y reconstituidas con las isoformas del receptor de insulina.

El estudio de la curva dosis-respuesta frente a la insulina permite conocer la menor concentración de dicha hormona que estimula la ruta de señalización intracelular de los cardiomiocitos *wild type* (Figura 63A). Se observó un aumento de la fosforilación de Akt ya a la dosis de insulina de 10nM. Sin embargo, ERK tiene una respuesta más moderada, aunque hay que tener en cuenta que la expresión basal de la proteína es más alta.

Mediante la curva de tiempo (Figura 63B) se puede observar que la insulina a concentración de 10 nM causa una estimulación a los cinco minutos de estar presente en el medio. Para todas las proteínas estudiadas, el estímulo se mantiene de forma sostenida hasta el final del experimento, aunque va decayendo poco a poco a medida que avanza el tiempo.

Como ya habíamos obtenido la concentración mínima de insulina a la que respondían las células y el tiempo óptimo, cuando obtuvimos las distintas líneas celulares para el receptor de insulina, estudiamos si respondían de igual modo a la línea CMWT y comprobamos que así era (Figura 63C).

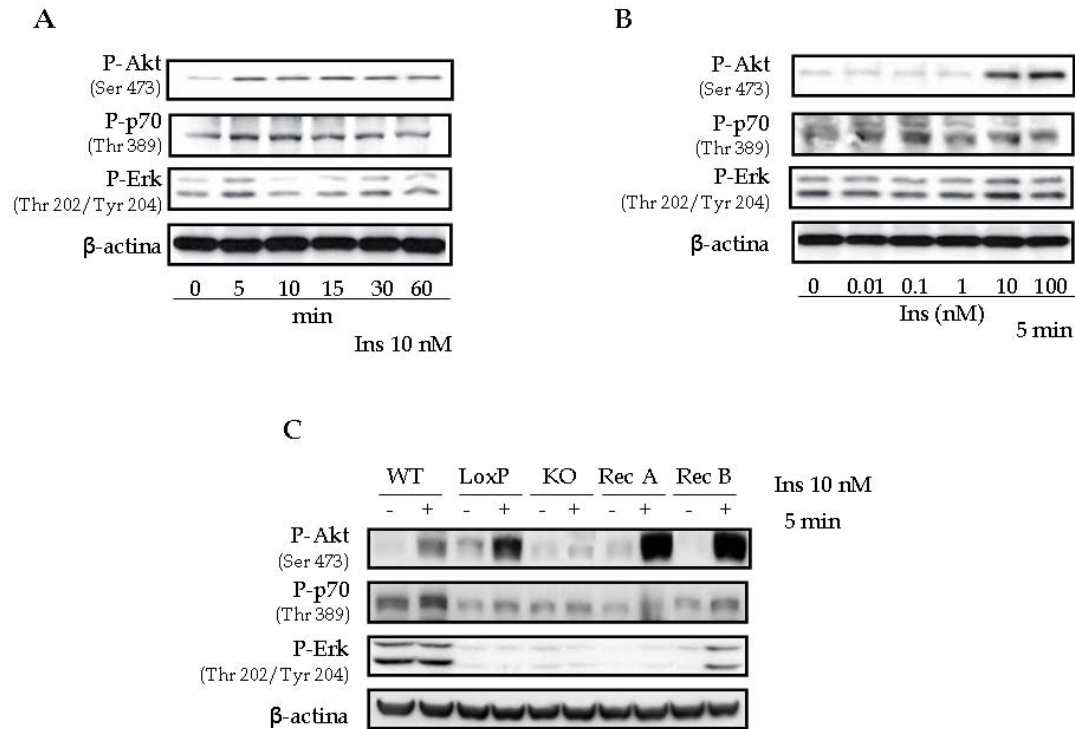


Figura 63. Estudio de la respuesta a la insulina en los cardiomiocitos. A) Curva de tiempo para comprobar el tiempo óptimo de estímulo con insulina en CM WT. B) Curva de dosis-respuesta para observar la menor dosis a la que ya se obtiene respuesta a la insulina en CM WT. C) Comprobación de la respuesta a insulina al tiempo y dosis elegidos en las cinco líneas celulares obtenidas.

A continuación, nos planteamos estudiar la resistencia a la insulina producida por los ácidos grasos en tejidos cardiovasculares, asimilándolo a una situación de dieta rica en grasas. Para ello, realizamos un tratamiento con el ácido oleico (ácido graso monoinsaturado de cadena larga y el más abundante en el tejido adiposo humano) y con el ácido palmítico (principal ácido graso saturado de cadena larga procedente de la dieta y el primer intermediario de la lipogénesis).

El primer paso que realizamos fue una curva de dosis respuesta del ácido oleico en las células CM WT para comprobar si este ácido graso provocaba la estimulación de distintas proteínas que intervienen de forma más o menos directa en el metabolismo de este nutriente celular (Figura 64).

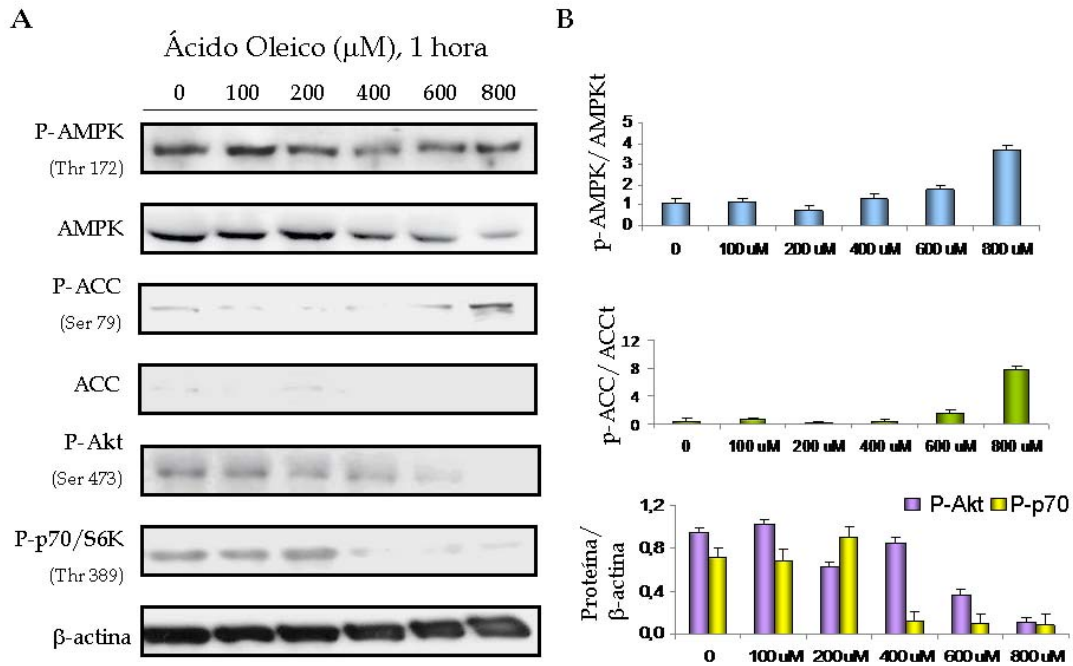


Figura 64. Estudio de la respuesta de los cardiomiocitos frente al ácido oleico. **A)** Curva de dosis-respuesta frente al ácido oleico. Estudio por Western blot de distintas proteínas implicadas en el metabolismo de los ácidos grasos. **B)** Cuantificación de la relación de proteína fosforilada y la total (en el caso de AMPK y ACC) o la proteína normalizadora β -actina (Akt y p70/S6K).

En un tratamiento de una hora con distintas dosis de ácido oleico, la mayor actividad de AMPK se observó a la dosis máxima estudiada (800 μ M), que se correspondió con la mayor inactivación de la principal diana de dicho enzima, la acetil-Co A carboxilasa (ACC). Por otro lado, Akt y AMPK tienen una relación inversa, de hecho, la primera inhibe a la segunda. Así que en la curva de dosis, observamos que tanto Akt como p70/S6K (enzimas implicadas en la respuesta a insulina y en la síntesis de proteínas), presentaban un descenso de su activación a medida que aumentaba la dosis de ácido oleico y la activación de AMPK.

Como pensamos que quizás se debía a una respuesta aguda al tratamiento con ácidos grasos, realizamos una curva de tiempo, estudiando desde tiempos cortos de estimulación (una hora) a tiempos prolongados (72h) y observamos como respondían los cardiomiocitos (Figura 65).

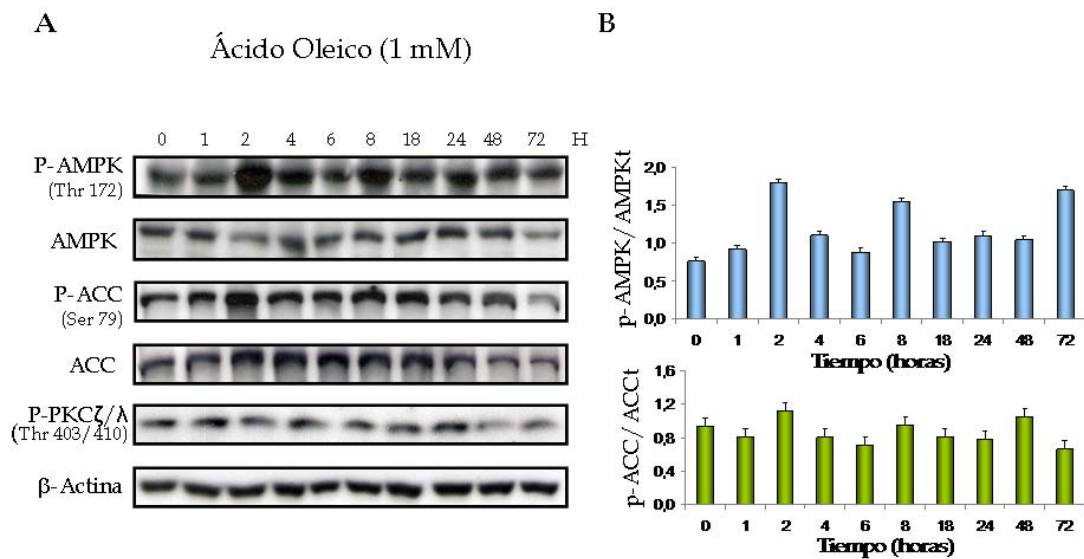


Figura 65. Estudio de la respuesta de los cardiomiocitos frente al ácido oleico. **A)** Curva de tiempo frente al ácido oleico. Estudio por Western blot de distintas proteínas implicadas en el metabolismo de los ácidos grasos. **B)** Cuantificación de la relación de proteína fosforilada y total.

Observamos que se presentaba un pico de máxima activación tras dos horas de estímulo con el ácido oleico en las proteínas implicadas en el metabolismo graso (AMPK y ACC). Pero también encontramos otros dos picos de activación a las 8 y a las 72 horas. Entre las dianas de AMPK también se encuentra la Lipasa Sensible a Hormonas (HSL), que al igual que ACC, es inactivada por AMPK mediante fosforilación de un residuo serina. Además, esta proteína es activada de forma indirecta por Akt (es decir, defosforilada), así que quisimos comprobar como reaccionaba esta proteína frente a un estímulo con ácido oleico a dosis máxima (1mM) a los tiempos de estimulación máxima de AMPK (2 y 8 horas, incluyendo un tiempo intermedio de 4 horas) y utilizamos todas las líneas celulares de cardiomiocitos de las que disponíamos (Figura 66).

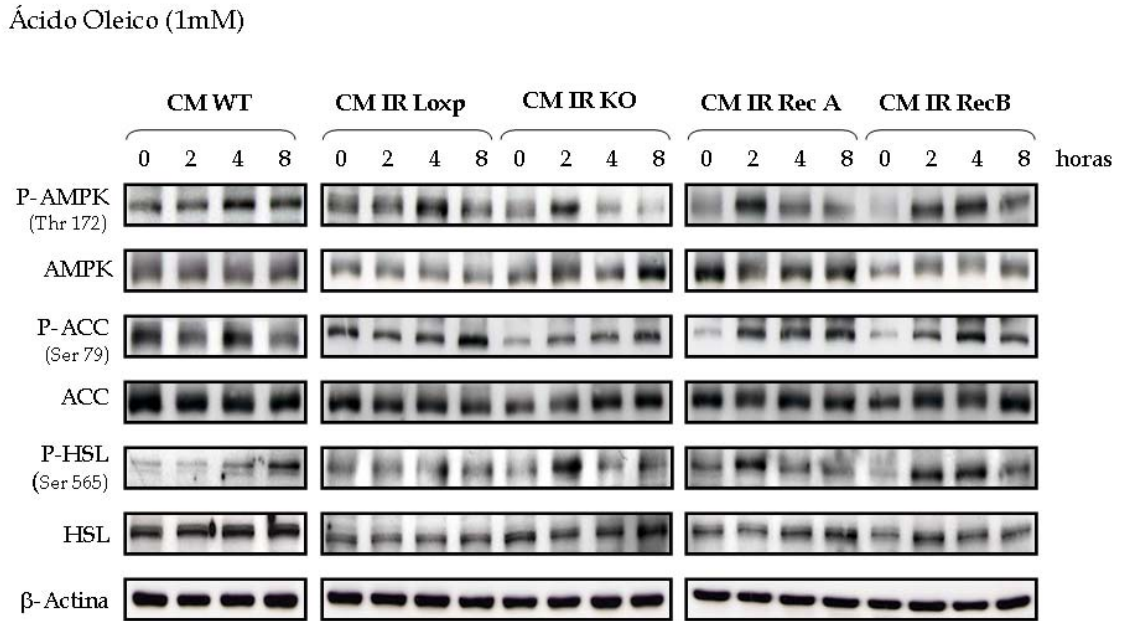


Figura 66. Estudio de la respuesta de los cardiomiocitos frente a ácido oleico. Estudio por Western blot de las distintas dianas de la AMPK.

Se observaron dos tipos de respuestas de AMPK frente al ácido oleico. Por un lado, las células con ambas isoformas del receptor de insulina (CM WT e CMIRLoxP) y la línea celular reconstituida con la isoforma B del receptor de la insulina, presentaron una activación máxima a las dos horas de estímulo, que se mantuvo a las cuatro y ocho horas. Por otro lado, la línea carente en el receptor de insulina y la línea celular reconstituida con la isoforma A del IR, presentaron una activación máxima de AMPK a las dos horas de estímulo, siendo menor en los tiempos de exposición más largos.

Esta dicotomía se reflejó de forma distinta en la inactivación por fosforilación de las distintas dianas estudiadas de AMPK. Así, ACC se fosforiló desde el primer momento y se mantuvo fosforilada durante todo el tiempo experimental, independientemente de que la fosforilación de AMPK disminuyera. Sin embargo, HSL mostró una modulación de su inactivación paralela a la de AMPK.

El siguiente paso fue estudiar si se producía resistencia a la insulina en presencia de distintas dosis de ácido oleico en las cinco líneas de cardiomiocitos obtenidas (Figura 67). Y observamos que había un comportamiento distinto en las líneas celulares. En ninguna de las líneas celulares que poseen el receptor de insulina se observaba una resistencia a dicha hormona respecto a la proteína Akt. En todas ellas, se

presentaba un aumento de fosforilación de dicha proteína cuando se estimulaban con insulina.

Respecto a la estimulación de AMPK con los ácidos grasos, sí se observó que cuando la insulina estaba presente, disminuía su activación. Siendo esta inactivación más importante cuando sólo se encuentra una de las isoformas del receptor de insulina. Respecto a la línea carente del receptor de insulina, se observó ausencia de respuesta tanto en presencia de ácido oleico, como en presencia de este ácido graso junto con insulina.

A continuación, comprobamos si este comportamiento era general a todos los ácidos grasos. Así, repetimos estos experimentos en presencia del ácido palmítico (Figura 68), que como ya hemos comentado anteriormente, es un ácido graso de cadena larga y sin dobles enlaces. Observamos que el comportamiento se repetía. No aparecía resistencia a la insulina en presencia del ácido palmítico respecto a Akt, salvo en la dosis máxima de este ácido graso en la línea reconstituida con la isoforma B. De la misma forma, observábamos que en presencia de insulina, la activación de AMPK disminuía, luego Akt estaría ejerciendo su efecto inhibitorio sobre esa enzima. Por tanto, los resultados observados anteriormente no se debían al tipo de ácido graso empleado.

De nuevo la línea CMIRKO tenía un comportamiento distinto al del resto, presentando ausencia de respuesta en presencia del ácido palmítico en solitario o junto con la insulina.

Un hecho relevante observado en los experimentos con ambos ácidos grasos, oleico y palmítico, es que la inhibición de ACC parece ser independiente de AMPK. Ya que la activación de AMPK no parece modular la fosforilación de su diana ACC.

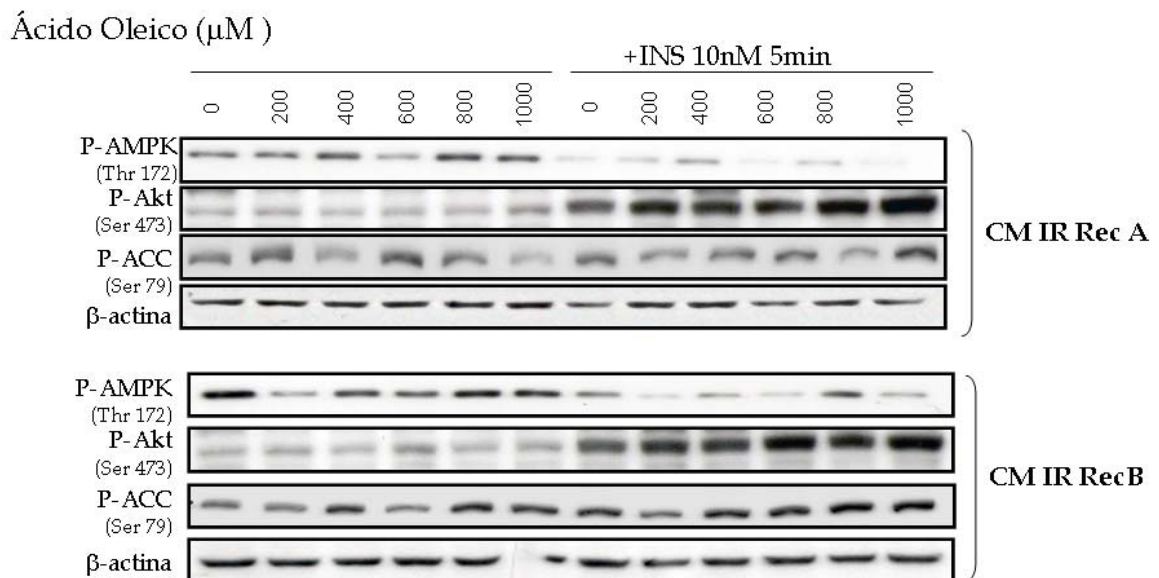
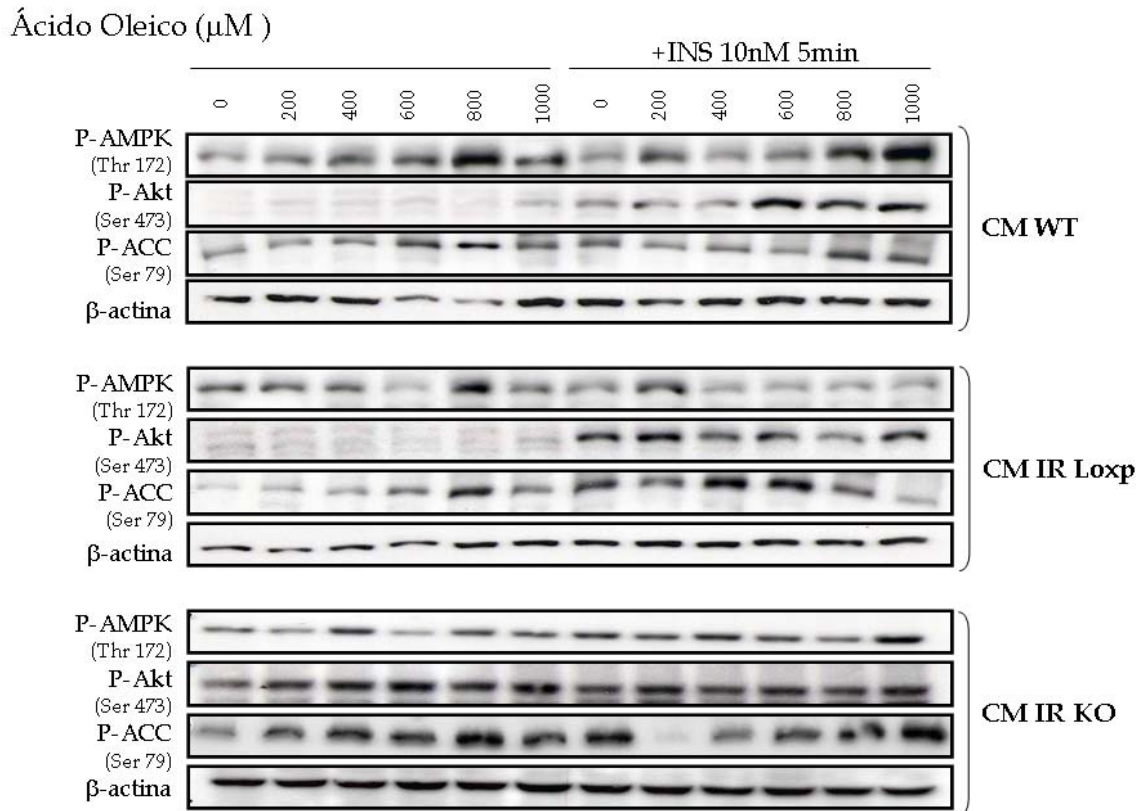


Figura 67. Tratamiento agudo con el ácido oleico y la insulina en cardiomiocitos. Estudio por Western blot de distintas proteínas implicadas en el metabolismo de ácidos grasos y de glucosa. En el panel superior, se observa el efecto de dicho tratamiento en las líneas CMWT, CMIRLoxP y CMIRKO. En el panel inferior, en las líneas reconstituidas con las isoformas del receptor de insulina.

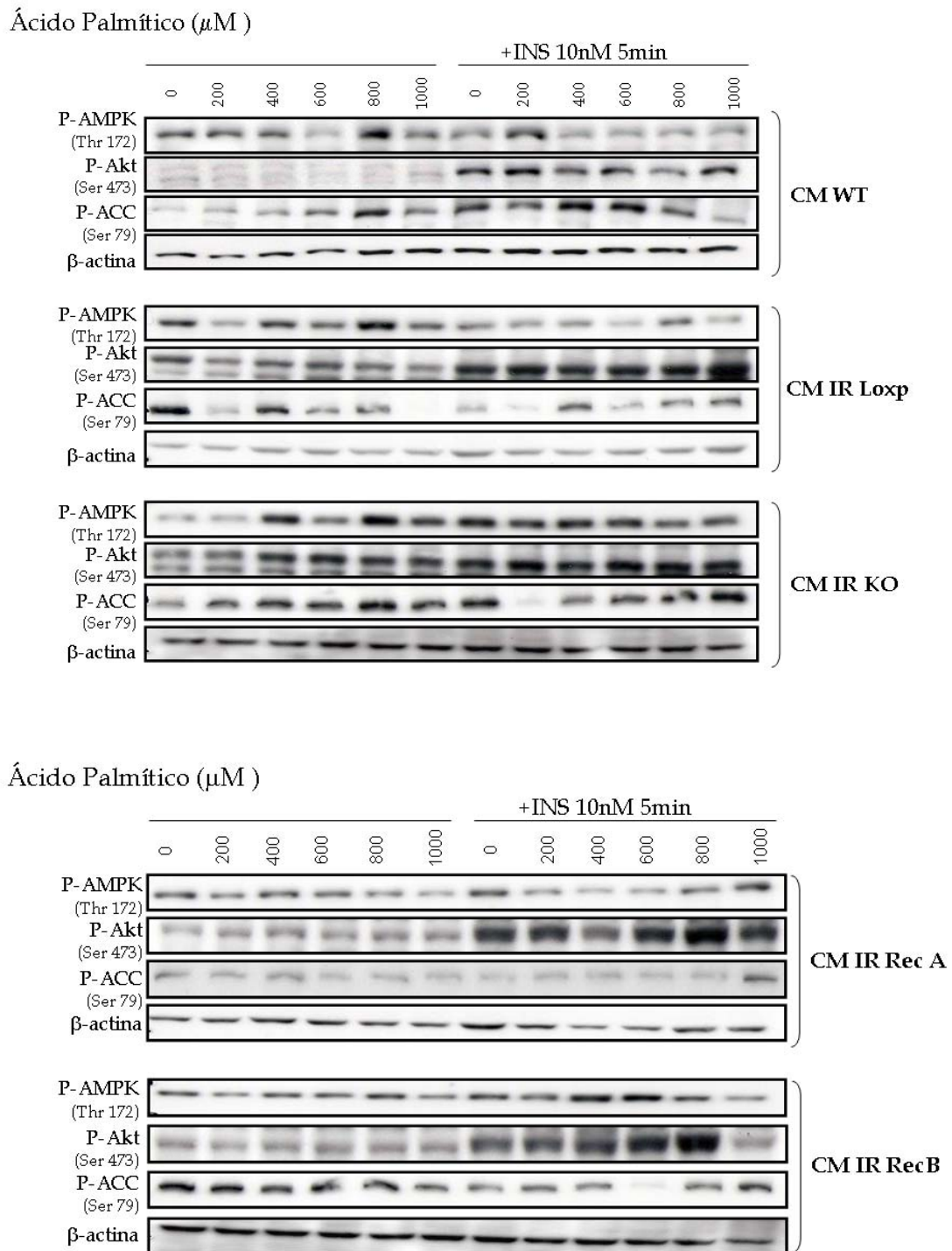


Figura 68. Tratamiento agudo con el ácido palmítico y la insulina en cardiomiocitos. Estudio por Western blot de distintas proteínas implicadas en el metabolismo de ácidos grasos y de glucosa. En el panel superior, se observa el efecto de dicho tratamiento en las líneas CMWT, CMIRLoxP y CMIRKO. En el panel inferior, en las líneas reconstituidas con las isoformas del receptor de insulina.

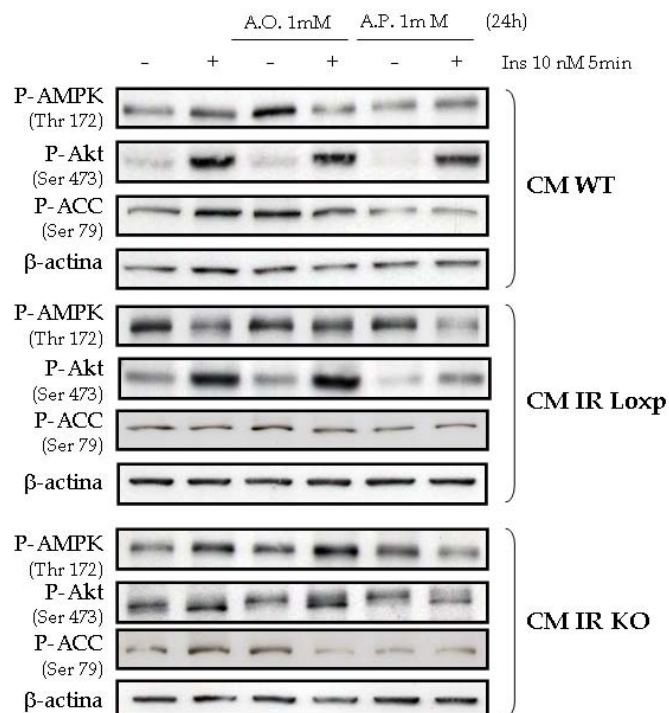
Para comprobar si este efecto se mantenía a tiempos largos, realizamos experimentos con ácidos grasos durante 24 horas con y sin estímulos de insulina (Figura 69).

De nuevo observamos que la mayoría de las líneas celulares no mostraron resistencia a la insulina tras un tratamiento crónico con ácidos grasos, ya sean saturados o insaturados, excepto un ligero descenso de la respuesta a insulina de la fosforilación de Akt en las líneas CMIRLoxP y CMIR Rec A, en la que parece que el ácido graso saturado a 24 horas de tratamiento, redujo la fosforilación de Akt.

Al contrario que en tiempo cortos de tratamiento, la activación de Akt no produjo un efecto inhibitor en la activación de AMPK en ninguna de las líneas celulares estudiadas.

La línea carente del receptor de insulina mostró de nuevo una ausencia de respuesta a cualquier estímulo.

También se observó que la fosforilación de ACC parece ser independiente de la fosforilación de AMPK, ya que, aunque esta proteína esté activa, ACC mantiene unos niveles de inactivación inalterables.



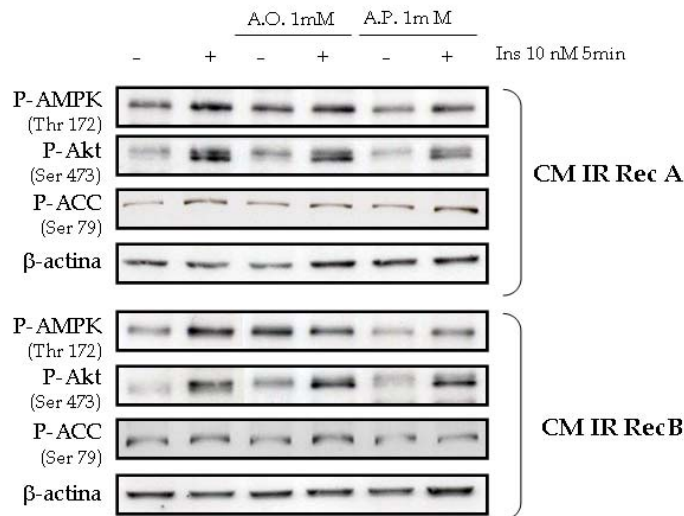


Figura 69. Tratamiento prolongado con ácidos grasos e insulina en cardiomiocitos. Estudio por Western blot de distintas proteínas implicadas en el metabolismo de ácidos grasos y de glucosa. En el panel superior, aparecen las líneas CM WT, CM IRLoxP, CMIRKO. En el panel inferior, están representadas las líneas reconstituídas con las isoformas del receptor de insulina. A.O.: ácido oleico. A.P.: ácido palmítico.

Por último, realizamos estudios de captación de glucosa en la línea CMWT frente a la insulina y el ácido oleico (Figura 70). No se observó una respuesta a la acción de la insulina mayor que el transporte basal. De hecho, independientemente de los estímulos utilizados no hubo una respuesta estadísticamente significativa.

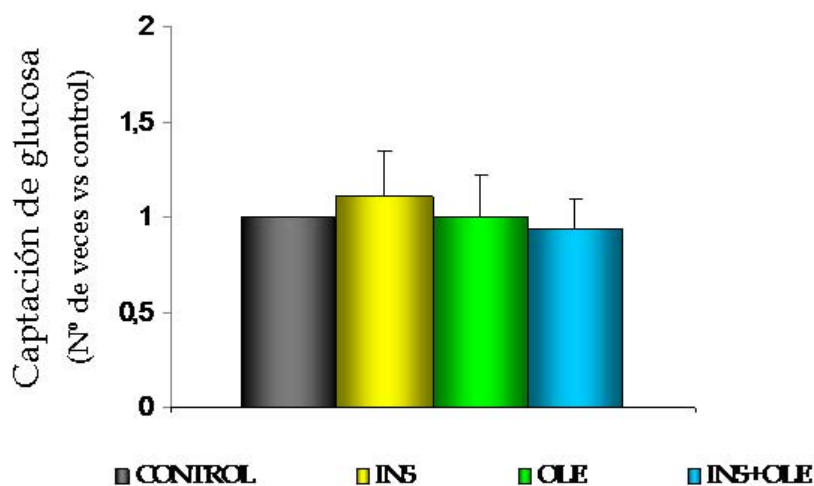


Figura 70. Estudio de la captación de glucosa en cardiomiocitos. Captación de glucosa marcada radiactivamente con tritio en cardiomiocitos *wild type* frente a insulina, ácido oleico y ambos estímulos juntos. INS: insulina; OLE: ácido oleico.

3.2. ESTUDIOS EN CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR

Debido a que el modelo celular de los cardiomiocitos que habíamos obtenido no captaba glucosa de forma dependiente de insulina, nos planteamos estudiar otras células vasculares en las que la captación de glucosa sí aumentara en respuesta a insulina, como las células de músculo liso vascular. Así, con este modelo *in vitro* podríamos comprobar si el comportamiento observado en las células cardiacas era único o si, por el contrario, era común a los modelos cardiovasculares.

Para ello, obtuvimos células del músculo liso de la aorta de ratones, y, de la misma forma que con los cardiomiocitos, llevamos a cabo su immortalización y comprobamos que las líneas celulares (WT e IRLoxP) presentaban AgT y habían secuestrado p53 (Figura 71A). A continuación, caracterizamos el cultivo primario y las líneas celulares y para ello realizamos un Western blot frente a α -actina de células de músculo liso (α -SMA), que es un marcador específico de diferenciación de estas células (Figura 71A y B). Se observó que el proceso de immortalización disminuyó ligeramente este marcador (Figura 71A) y que las cinco líneas celulares immortalizadas presentaban niveles comparables de dicho marcador (Figura 71A y B).

Después de la obtención de la línea celular CMLV IRLoxP, se procedió a la obtención de las líneas IRKO, Rec A y Rec B. Para ello, lo primero que se hizo fue infectar la línea LoxP con el AdenoCRE que permitía eliminar el receptor de insulina flanqueado por las secuencias LoxP. A continuación, mediante infección retroviral, se reconstituyó con las isoformas del receptor de insulina. Comprobamos que se habían obtenido las líneas celulares mediante Western blot y RT-PCR (Figura 71B y C, respectivamente).

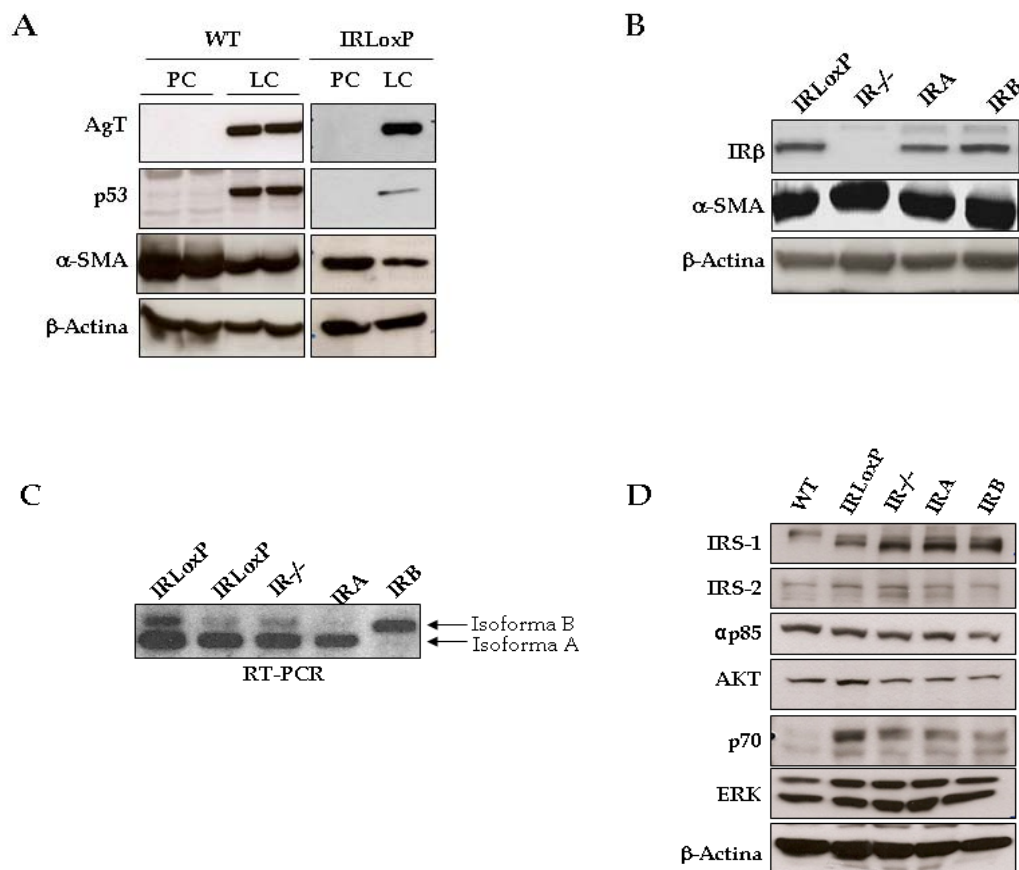


Figura 71. Caracterización de las células de músculo liso vascular. A) Comprobación de la immortalización de las células y de que el tipo celular obtenido es el deseado. Estudio por Western blot de la expresión de AgT, p53 y α -SMA. B) Estudio por Western blot de la eliminación del receptor de insulina y la posterior reconstitución con las isoformas de dicho receptor. C) Estudio por RT-PCR de la reconstitución con el receptor de insulina. D) Estudio de ruta de la señalización de insulina en las cinco líneas celulares obtenidas.

Además, se realizó una caracterización de la ruta de señalización intracelular de la insulina (Figura 71D) y se observó que las células de músculo liso vascular de ratón adulto expresaban muchas de las proteínas implicadas en la ruta de señalización de la insulina. Observamos un aumento de IRS-1 en las células sin receptor y reconstituidas con las isoformas del IR, lo que puede deberse a una compensación por la pérdida del receptor, ya que este sustrato del IR es el mayoritario en células musculares.

Por otro lado, realizamos estudios de la captación de glucosa marcada radiactivamente con tritio en las CMLV bajo dos dosis de insulina. Observamos que la mayor captación de glucosa se obtenía a la dosis máxima de insulina tanto en las células con el receptor de insulina flanqueado por secuencias LoxP como en la línea

reconstituida con la isoforma A del receptor de insulina (Figura 72). Por tanto, comprobamos que estas líneas celulares tenían captación de glucosa insulino dependiente, hecho diferencial con el modelo *in vitro* de cardiomiocitos previamente estudiado.

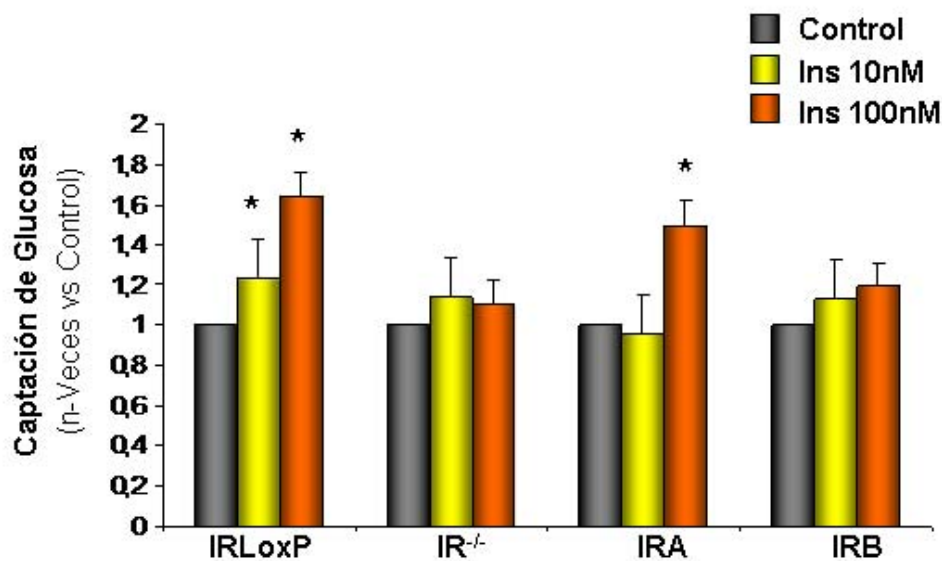


Figura 72. Estudio de la captación de glucosa en células de músculo liso vascular. Captación de glucosa marcada radiactivamente con tritio en las distintas líneas de CMLV obtenidas. Ins: insulina * $p < 0,05$ vs control

Realizamos estudios con los mismos ácidos grasos, ácido oleico y palmítico, que utilizamos con los cardiomiocitos y en las mismas condiciones, es decir, dosis crecientes durante un tiempo de estimulación de dos horas (Figura 73). Observamos que ambos ácidos grasos activaron AMPK, aunque el ácido oleico provocó una activación más fuerte en las CMLV WT. ACC, principal diana de la AMPK mostró una inactivación alta desde el principio del experimento y no se modificó al aumentar las dosis. Otra de las dianas de AMPK que se ha estudiado fue HSL, que no mostró variación con ninguna de las dosis, de ninguno de los dos ácidos grasos (Figura 73).

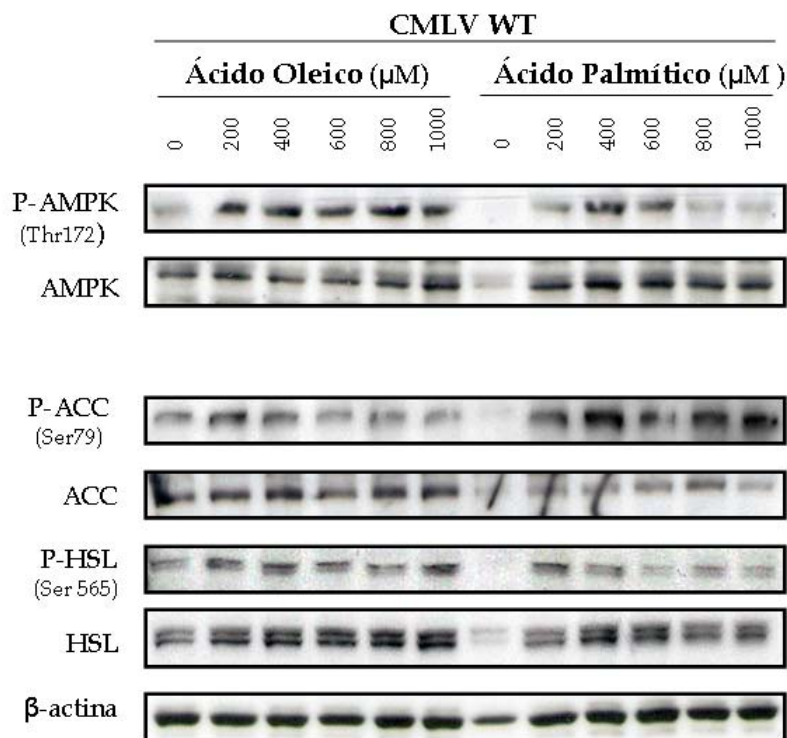


Figura 73. Estudio de la estimulación con ácidos grasos en CMLV WT. Estudio por Western blot de distintas proteínas implicadas en el metabolismo de la glucosa y de los ácidos grasos. A la izquierda, se encuentran las dosis de ácido oleico y a la derecha las de ácido palmítico.

A continuación realizamos los mismos experimentos en las líneas celulares que poseen modificación en el receptor de insulina, empezando por las líneas con el receptor flanqueado por secuencias LoxP y las líneas carentes de IR (Figura 74).

Se observó que el ácido oleico indujo respuestas diferentes en la vía de señalización de AMPK en las células con y sin el receptor de insulina. Así, en las CMLV IRLoxP, observamos un incremento en la fosforilación de AMPK frente a dosis crecientes del ácido oleico. Esta activación se corresponde con la fosforilación de ACC, siendo más notoria a las dosis más altas, y un aumento en la fosforilación de HSL, que es menos dependiente de la dosis empleada. Sin embargo, en las CMLV IRKO parece que el ácido oleico tuvo un efecto de saturación, ya que a las dosis altas, las células de músculo liso vascular tuvieron una menor respuesta de AMPK que a dosis más bajas. Respecto a la primera de las dianas de AMPK que hemos estudiado, observamos un aumento de la fosforilación de ACC frente a dosis más bajas del ácido oleico, disminuyendo el aumento a dosis más altas. Así, tanto en las CMLV con y sin receptor de insulina el aumento de la fosforilación de ACC, y por tanto su inactivación, se

corresponde con los aumentos en la fosforilación de AMPK. Por otro lado, HSL aumentó su fosforilación en respuesta a la estimulación con el ácido oleico, pero no se produjo un efecto dependiente de la dosis de ácido graso empleada (Figura 74).

Cuando empleamos el otro ácido graso, observamos que el ácido palmítico inducía la fosforilación y activación de AMPK y la fosforilación e inactivación de ACC y HSL en las CMLV con y sin receptor. Sin embargo, los efectos que encontramos en respuesta al ácido palmítico, eran menos dependientes de la dosis empleada, en contraposición a lo que ocurría cuando estimulábamos con el ácido oleico (Figura 74).

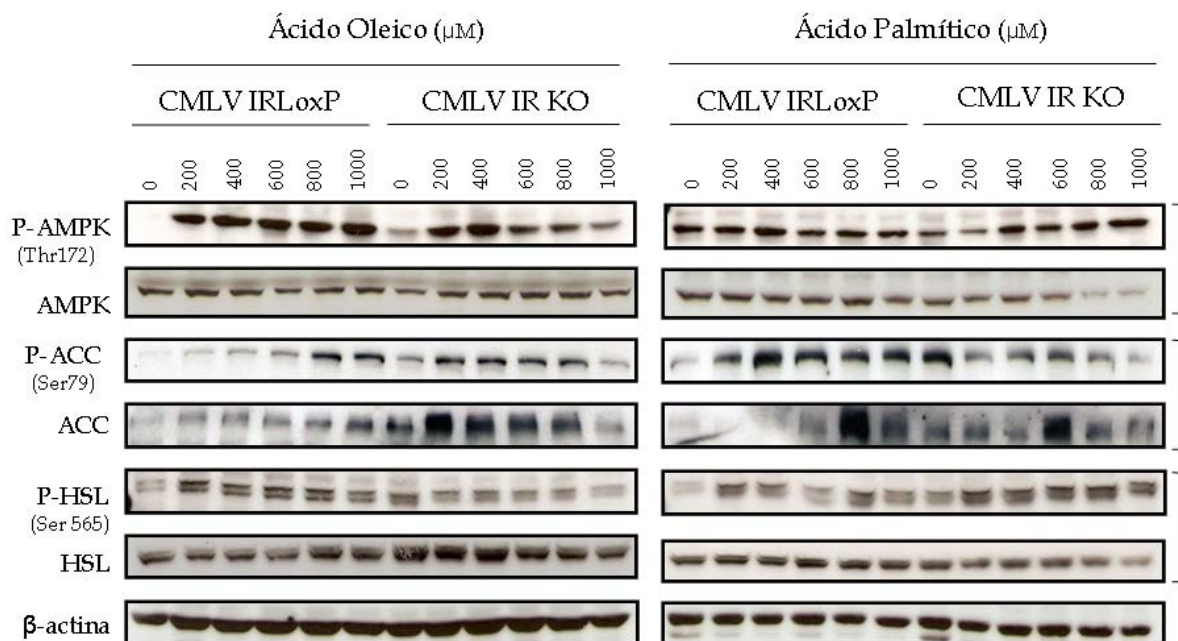


Figura 74. Estudio de la estimulación con ácidos grasos en CMLV IRLoxP e IRKO. Estudio por Western blot de distintas proteínas implicadas en el metabolismo de la glucosa y de los ácidos grasos. A la izquierda, se encuentran las dosis de ácido oleico y a la derecha, las de ácido palmítico.

También realizamos estos experimentos con las líneas celulares reconstituidas con las isoformas del receptor de insulina (Figura 75).

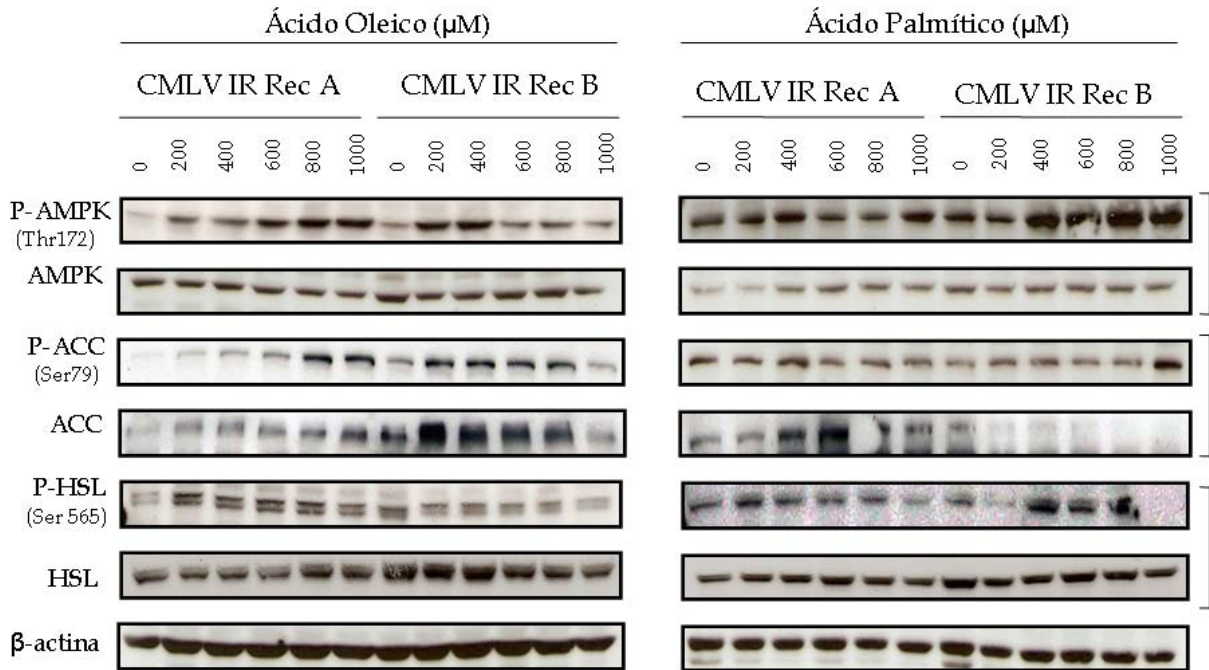


Figura 75. Estudio de la estimulación con ácidos grasos en CMLV IR Rec A e IR Rec B. Estudio por Western blot de distintas proteínas implicadas en el metabolismo de la glucosa y de los ácidos grasos. A la izquierda, se encuentran las dosis de ácido oleico y a la derecha, las de ácido palmítico.

En la Figura 75, se puede observar que la respuesta de IR Rec A e IR Rec B a los ácidos grasos fue la misma que en el caso de las líneas IRLoxP e IRKO, respectivamente. AMPK tuvo una mayor activación en las CMLV IR Rec A en respuesta a las dosis más altas de ácido oleico, mientras que en la línea celular reconstituida con la isoforma B del receptor de insulina, apareció una respuesta contraria, encontrándose una menor activación de AMPK con las dosis más altas. ACC se inactivó más en la línea CMLV Rec B, sin embargo, HSL mostró una respuesta independiente de la dosis empleada de ácido oleico.

Respecto al ácido palmítico, en ambas líneas celulares, no se observó una respuesta dependiente de dosis en ninguna de las proteínas, salvo AMPK en el caso de las CMLV Rec B, pero la estimulación basal ya era muy alta.

Debido a que las respuestas de las líneas celulares a los estímulos del ácido palmítico eran independientes de la dosis empleada y que los resultados obtenidos con el ácido oleico mostraban una modulación en función de la dosis empleada decidimos que los experimentos para estudiar la respuesta a la acción de la insulina después de

un tratamiento agudo con ácidos grasos, los realizaríamos con el ácido oleico (Figura 76).

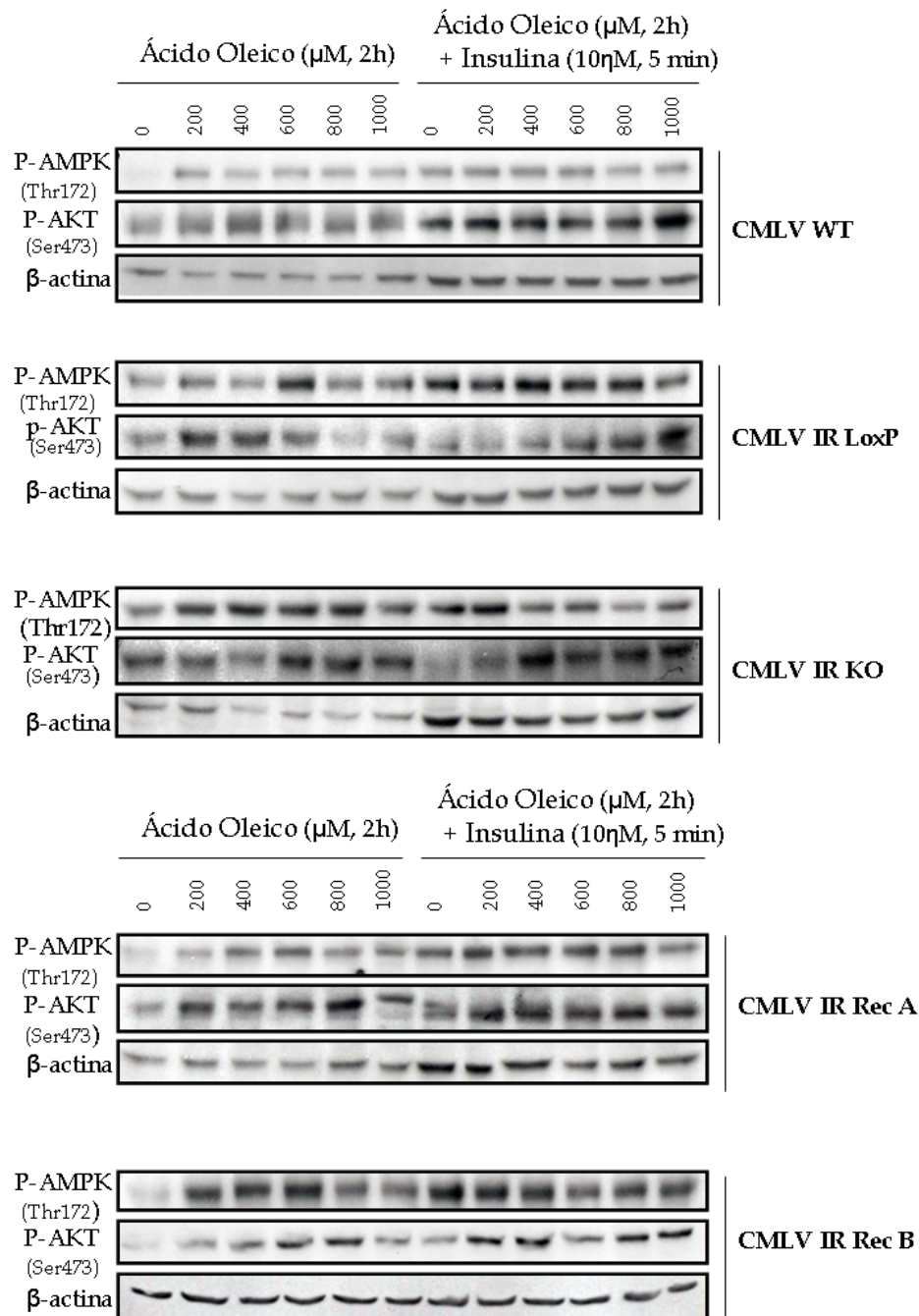


Figura 76. Estudio de la respuesta a la insulina tras un tratamiento con ácido oleico durante dos horas en células de músculo liso vascular de aorta. Estudio por Western blot de distintas proteínas implicadas en el metabolismo de la glucosa y de los ácidos grasos. A la izquierda, se encuentran las dosis de ácido oleico y a la derecha, el tratamiento con ácido oleico e insulina.

Observamos que, después de un tratamiento de las distintas líneas celulares durante dos horas con el ácido oleico, y una posterior estimulación con insulina

durante cinco minutos, las líneas que cuentan con el receptor de insulina, ya sea *wild type*, flanqueado por secuencias LoxP o con una sola de las isoformas de dicho receptor, seguían manteniendo la respuesta de Akt frente a la insulina, es decir, independientemente del tratamiento con el ácido oleico. Así, cuando se realizó un estímulo con insulina en presencia del ácido oleico, la proteína Akt mantenía su fosforilación en respuesta a la hormona. Por lo tanto, estas líneas no desarrollaron resistencia a la insulina como consecuencia de la exposición al ácido oleico.

Por el contrario, en la línea celular carente del receptor de insulina, dicha hormona no indujo la fosforilación de Akt, pero sí parece que se produjo un descenso en la activación de AMPK en las dosis más altas de ácido oleico en presencia de insulina. Por ello es posible que, independientemente de la acción de Akt en la ruta de señalización de la insulina, exista un mecanismo que en presencia de insulina inactive AMPK.

Para comprobar si un tratamiento crónico con los ácidos grasos producía este mismo comportamiento o inducía resistencia a la insulina, tratamos a las células con la dosis máxima de ácidos grasos durante 24 horas y un posterior estímulo con insulina (Figura 77). En todas las líneas celulares estudiadas, observamos que no se produjo resistencia a la insulina en relación a la fosforilación de Akt, en presencia del ácido oleico. Sin embargo, el tratamiento prolongado con el ácido palmítico sí redujo la fosforilación de Akt en la línea IR Rec A. Además, la activación de Akt no disminuyó la activación de AMPK, es decir, no ejerció su papel inhibitorio. También se pudo observar que el ácido palmítico produce menor activación de AMPK que el ácido oleico.

En cuanto a la inactivación de ACC debida a la fosforilación inhibitoria causada por AMPK, se observa que va en paralelo con la fosforilación de AMPK. Es decir, cuando la fosforilación de AMPK aumenta, lo hace también la de ACC, de manera que cuando AMPK se activa, ACC se inactiva en la misma medida.

Finalmente, la línea celular carente del receptor de insulina, no presentó respuesta frente a ninguno de los estímulos; AMPK no se activó frente a ninguno de los ácidos grasos, y de la misma forma, Akt no respondió a los estímulos de insulina.

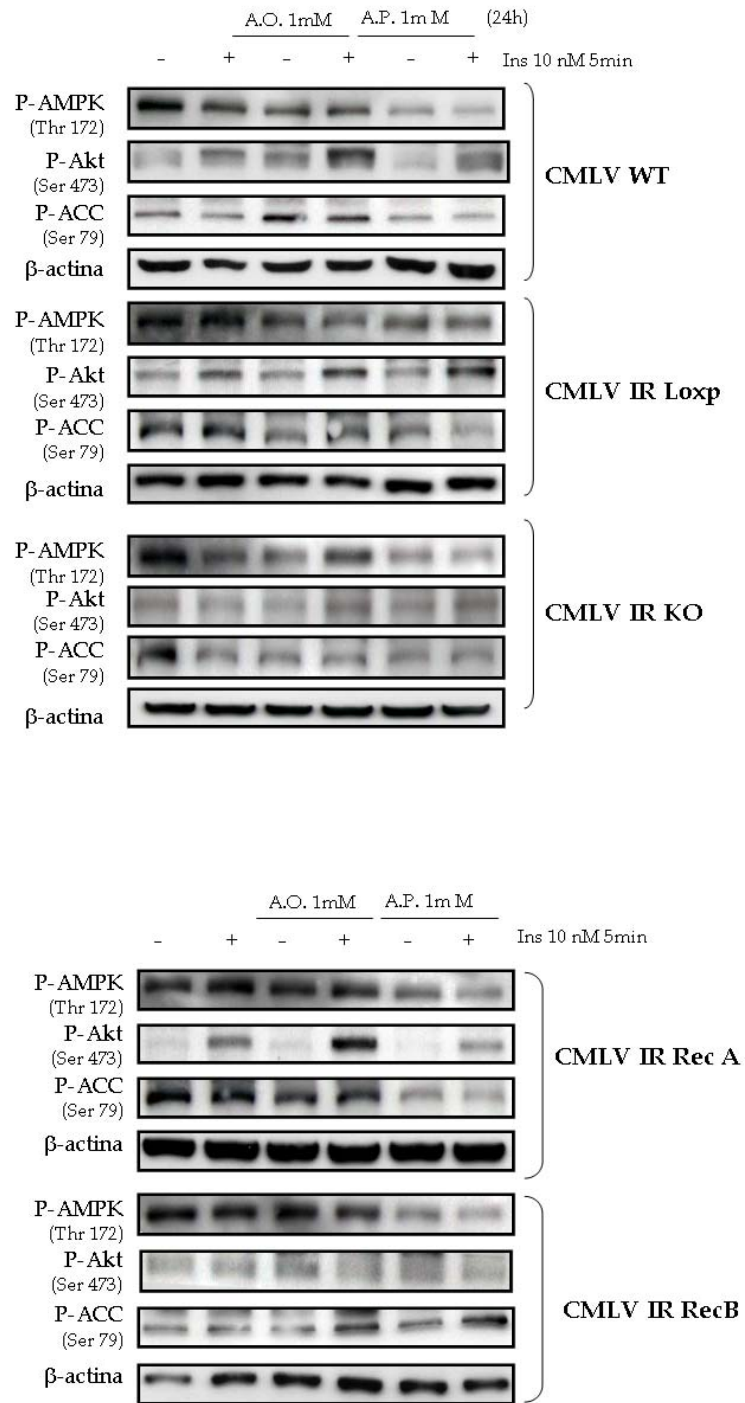


Figura 77. Estudio de la respuesta a insulina tras un tratamiento con los ácidos grasos durante 24 horas en células de músculo liso de aorta. Estudio por Western blot de distintas proteínas implicadas en el metabolismo de la glucosa y de los ácidos grasos. A.O.: ácido oleico; A.P.: ácido palmítico.

Discusión

1. PAPEL DE LOS MECANISMOS COMPENSATORIOS FRENTE A LA RESISTENCIA A LA INSULINA EN EL DAÑO VASCULAR EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE OBESIDAD

El tejido adiposo marrón se encarga de la termogénesis y del gasto de energía corporal. Nuestro modelo presenta lipoatrofia marrón severa como consecuencia de la deleción específica del receptor de insulina en el tejido adiposo marrón. Ya en 1993, se describió que la ablación de este tejido confería susceptibilidad a la obesidad en ratones [Lowell y col., 1993] y más recientemente, se ha descrito que la presencia de tejido adiposo marrón en altas cantidades en adultos humanos, podría tener un efecto protector frente a la obesidad relacionada con la edad [Cypess y col., 2009].

Con estos antecedentes, decidimos utilizar el ratón BATIRKO para generar un modelo de obesidad inducido por una dieta rica en grasas. De manera que obtuvimos un ratón BATIRKO obeso que presentaba resistencia a la acción de la insulina y una peor tolerancia a la glucosa que ratones con el mismo genotipo pero sin obesidad. Sin embargo, cuando estudiamos las concentraciones plasmáticas de insulina, observamos dos grupos de ratones BATIRKO obesos. Un grupo mayoritario presentaba normoinsulinemia (por este motivo lo denominamos N) y una moderada hiperglucemia en el ayuno. Sin embargo, el segundo grupo (al que denominamos H y era minoritario) tenía una moderada hiperinsulinemia como mecanismo compensatorio a la resistencia a la insulina, siendo esta elevación de la concentración de insulina en sangre similar a la descrita en pacientes obesos con resistencia a la insulina [Srinivasan y col., 1999].

Sin embargo, éstas no fueron las únicas diferencias entre los dos grupos. Los ratones obesos e hiperinsulinémicos, mostraron hiperplasia de la célula β pancreática, una vez más, de acuerdo a los modelos descritos de obesidad con hiperinsulinemia [Jetton y col., 2005]. Por otro lado, el grupo de ratones BATIRKO obesos con normoinsulinemia, a pesar de tener resistencia a la insulina, no mostraba hiperplasia de la célula β , sugiriendo un fallo en los mecanismos compensatorios que se discutirá más adelante.

Se han desarrollado recientemente modelos murinos de síndrome metabólico, con objeto estudiar el papel que desempeña el tejido adiposo blanco en el desarrollo de la enfermedad, ya que, aparte de su función como almacén de energía, también se le

reconoce una función como órgano endocrino secretor de distintas sustancias bio-reactivas al torrente sanguíneo, como por ejemplo adiponectina [Lara-Castro y col., 2007]. En uno de los modelos de síndrome metabólico se ha descrito que la resistencia a la insulina en el tejido adiposo blanco se asocia con la sobre-expresión de TNF- α y con el descenso de adiponectina [Akagiri y col., 2008]. En este contexto, nuestros dos grupos de animales BATIRKO obesos también presentaron diferencias. Así, el ratón BATIRKO obeso con hiperinsulinemia, restauró la señalización de insulina en el tejido adiposo blanco y mostró concentraciones plasmáticas de TNF- α bajas y de adiponectina completamente normales. Por el contrario, los ratones BATIRKO con insulinemia normal y que fallaban en la compensación de la resistencia a la acción de la insulina, mostraron un empeoramiento en la señalización de dicha hormona en el tejido adiposo blanco, a la vez que concentraciones elevadas de TNF- α y bajas de adiponectina a nivel plasmático.

Nuestro grupo había descrito previamente que el ratón BATIRKO presentaba un defecto intrínseco de la secreción de insulina [Guerra y col., 2001]. Ahora, describimos dos grupos de ratones BATIRKO obesos que muestran mecanismos compensatorios diferenciales en respuesta a su resistencia a la insulina. El grupo hiperinsulinémico, mostró unos niveles de insulina basales altos y un ligero incremento de los mismos en repuesta a la sobrecarga de glucosa. El segundo grupo, el normoinsulinémico, mostró un fallo severo de la secreción aguda de insulina. Además, encontramos una correlación positiva y significativa entre la expresión del ARNm de UCP-1 en el tejido adiposo marrón y la del ARNm de UCP-2 en los islotes pancreáticos. Este hecho sugiere que el aumento de ambos marcadores termogénicos está implicado en los mecanismos compensatorios frente a la lipoatrofia marrón generada en los animales BATIRKO. Además, se demostró una relación inversa entre los niveles de expresión de UCP-2 en los islotes pancreáticos y la secreción de insulina de los ratones BATIRKO obesos. Este resultado insinúa que la expresión de UCP-2 en los islotes pancreáticos podría regular, al menos en parte, los mecanismos compensatorios diferenciales frente a la resistencia a la insulina observados en los ratones BATIRKO obesos. En este sentido, se ha descrito un papel negativo de UCP-2 en la modulación de la secreción de insulina inducida por glucosa en las células β del páncreas [Zhang y col., 2001]. Así, BATIRKO obeso es un modelo único para estudiar el papel de los mecanismos compensatorios en respuesta a la resistencia a la insulina y el daño vascular.

Otra diferencia encontrada entre ambos grupos de ratones BATIRKO obesos fue su perfil lipídico. El ratio cLDL/cHDL fue tres veces inferior en el grupo hiperinsulinémico que en el normoinsulinémico. Estos resultados sugieren que existe un riesgo vascular diferencial entre ambas poblaciones de ratones BATIRKO obesos. Recientemente, se ha descrito que el balance entre cLDL y cHDL es crucial para el desarrollo de la aterogénesis. En este sentido, el ratio cLDL/cHDL resulta ser un mejor marcador pronóstico para la aterosclerosis que la medida aislada de LDL [Tamada y col., 2010]. En nuestro modelo, el grupo BATIRKO obeso normoinsulinémico con mayor ratio cLDL/cHDL tenía disfunción endotelial y un agravamiento del daño vascular. Sin embargo, el ratón BATIRKO obeso hiperinsulinémico con menor ratio cLDL/cHDL presentó una atenuación del daño vascular. Recientemente, se ha descrito que la elevación de TNF- α podría explicar parcialmente el riesgo de eventos cardiovasculares en pacientes con niveles bajos de cHDL [Yamagishi, S. y col., 2009]. Así, se ha establecido que cHDL es capaz de reducir la producción de TNF- α por monocitos y macrófagos sobre las células T estimuladas o en corazones sometidos a isquemia-reperfusión [Burger y Dayer 2002; Calabresi y col., 2003, respectivamente]. Estos trabajos sugieren que una de las propiedades antiinflamatorias de las cHDL sería el papel como regulador negativo de los niveles circulantes de TNF- α . Además, cHDL tiene también propiedades antioxidantes [Kontush y col., 2005], entre ellas, proteger a los lípidos plasmáticos, incluido el cLDL, frente a la oxidación, suprimiendo la señalización proinflamatoria de los lípidos oxidados, reduciendo así los niveles circulantes de TNF- α . En nuestro modelo, observamos que el grupo de ratones BATIRKO obesos hiperinsulinémicos con elevados niveles de cHDL mostraron niveles circulantes bajos de TNF- α . Sin embargo, el grupo de ratones BATIRKO obesos normoinsulinémicos con niveles bajos de cHDL mostraron elevados niveles circulantes de cLDL y de TNF- α .

Por otro lado, se ha descrito que las HDL tienen la capacidad de modular el metabolismo de la glucosa en pacientes diabéticos tipo 2. En este tipo de pacientes una elevación de los niveles plasmáticos de HDL se ha demostrado que reducen la glucemia. Esta reducción podría ocurrir a través de mecanismos que incrementen la metabolización de la glucosa como la elevación de la insulina plasmática y la activación de AMPK en el músculo esquelético [Drew y col., 2009]. Además, en células endoteliales se ha descrito que las HDL inducen la activación de Akt y de eNOS, la inhibición de la adhesión de monocitos y la expresión de moléculas de adhesión

dependientes de la activación de AMPK [Kimura y col., 2010]. De acuerdo con estos trabajos, nosotros observamos que el ratón BATIRKO obeso con elevados niveles de HDL y una moderada hiperinsulinemia no presentó hiperglucemia en el ayuno. Sin embargo, el ratón BATIRKO obeso normoinsulinémico con menores niveles de cHDL tenía un severo defecto en la secreción de insulina y una moderada pero significativa hiperglucemia en el ayuno.

Para estudiar si el perfil lipídico diferencial que habíamos obtenido en ambos grupos de BATIRKO obesos se correspondía también con mayores o menores alteraciones vasculares, analizamos la función vascular diferencial en ambos grupos de ratones BATIRKO. Y encontramos que el ratón BATIRKO obeso y normoinsulinémico, con un alto ratio de cLDL/cHDL, tuvo una mayor respuesta contráctil inducida por angiotensina II o por el análogo del tromboxano A₂ comparado con los ratones control o con el grupo hiperinsulinémico de BATIRKO obeso. En este sentido, ha sido descrito que la Ang II y el TxA₂ indujeron mayores respuestas contráctiles en ratas Zucker obesas [Siddiqui y Hussain 2007] y en anillos aórticos de ratones sometidos a una dieta rica en glucosa [Nobe y col., 2003]. Además, este mismo grupo de ratones BATIRKO obesos con normoinsulinemia presentó disfunción endotelial comparado con los ratones BATIRKO obesos del grupo con hiperinsulinemia, debido en parte a un descenso significativo de la expresión de eNOS en la aorta. En otros modelos, la disfunción endotelial también se asoció con una expresión reducida de eNOS en la aorta de ratones diabéticos de genotipo *db/db* [Su y col., 2008], o con un aumento de la producción de ROS, que inhiben la regulación de eNOS dependiente de Akt en la aorta de ratas Zucker obesas [Naruse y col., 2006]. En lo que se refiere a la producción de ROS, observamos un aumento significativo del anión superóxido y de los niveles de nitrotirosina en los arcos aórticos del grupo normoinsulinémicos *versus* el hiperinsulinémico, lo que podría contribuir al daño vascular diferencial. A este respecto, se observó una mayor acumulación lipídica y un aumento del área de la lesión aterosclerótica en el arco aórtico del grupo de ratones BATIRKO obesos normoinsulinémicos respecto al grupo con hiperinsulinemia.

Otra consecuencia derivada de la disfunción endotelial es el reclutamiento, la adhesión y la migración de monocitos al espacio subcelular, asociados con un aumento de la expresión de ARNm de MCP-1 [Simionescu 2007] y otras citoquinas proinflamatorias. En este sentido, el grupo de ratones BATIRKO obesos

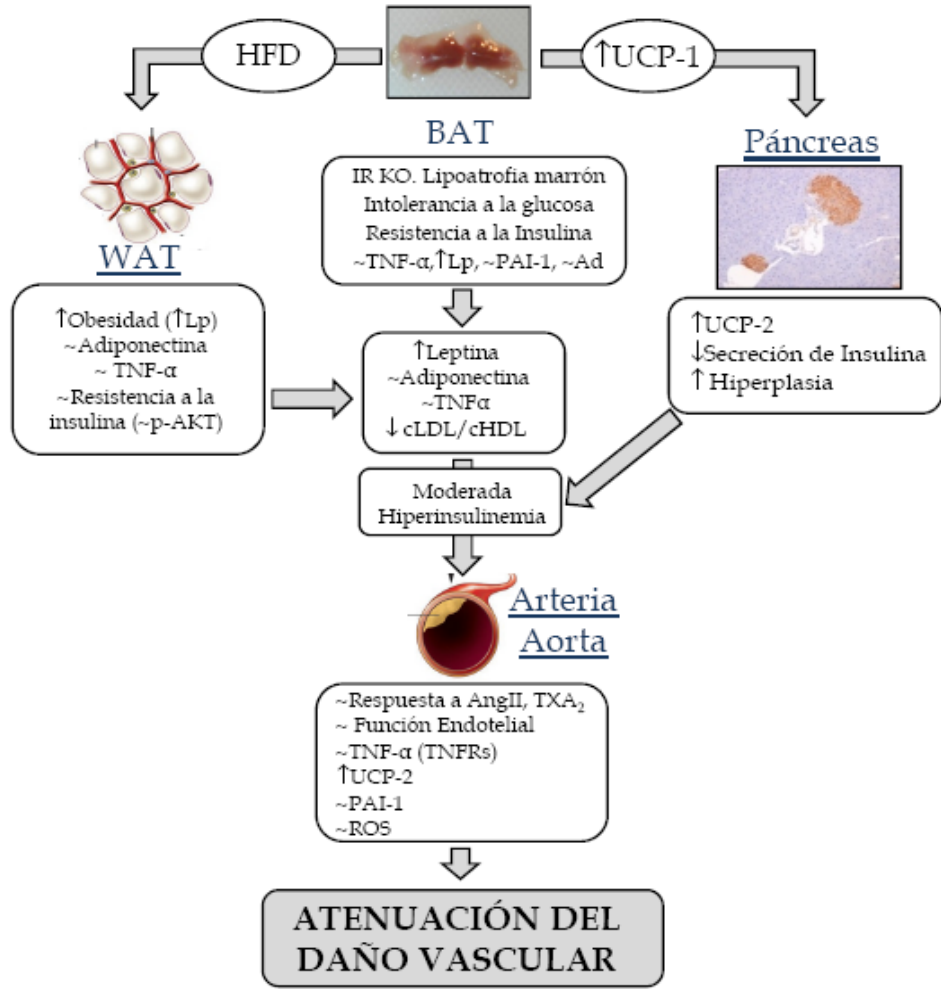
normoinsulinémicos que mostraron disfunción endotelial tuvieron una mayor expresión de MCP-1, TNF α , y sus receptores en aorta, y una mayor infiltración de macrófagos en el arco aórtico. Este hecho no se dio en el grupo de los ratones con hiperinsulinemia. Este aumento local de TNF- α en la aorta junto con las concentraciones plasmáticas elevadas de TNF- α generado por ambos tejidos adiposos podría estar asociado con la disfunción del sistema arterial sistémico, tal y como se ha descrito en sujetos obesos [Apovian y col., 2008]. Además, un aumento local en la aorta de la expresión de TNF- α podría aumentar la expresión de PAI-1. Así, PAI-1 también aumentaría en la aorta de los ratones BATIRKO obesos con normoinsulinemia, lo que proporcionaría evidencias adicionales de un mayor daño vascular en este grupo respecto al hiperinsulinémico. En este contexto, se ha descrito que la procoagulabilidad aumenta el riesgo de síndrome coronario agudo en pacientes diabéticos debido a un incremento de la agregación plaquetaria asociado con concentraciones plasmáticas elevadas de PAI-1 [Kohler y Grant 2000]. Además, un incremento en la producción de PAI-1 podría ser clave en el desarrollo de la enfermedad vascular en pacientes diabéticos. En este sentido, se ha descrito que los niveles de PAI-1 están fuertemente correlacionados con la resistencia a la insulina [Juhan-Vague y col., 1991] y son buenos predictores del desarrollo de la diabetes [Festa y col., 2002].

Los estados de resistencia a la insulina asociados con obesidad movilizan lípidos desde el tejido adiposo blanco visceral hacia otros tejidos periféricos. De hecho, observamos que el hígado graso es una característica común de los ratones BATIRKO obesos comparados con los que no son obesos o con los animales control independientemente de su estado compensatorio. De forma notoria, la acumulación lipídica fue muy dependiente de la expresión de UCP-2 en el hígado, en el corazón y en la arteria aorta, y de UCP-3 en el músculo esquelético. En este sentido, nuestros resultados ponen de manifiesto que los ratones BATIRKO obesos con hiperinsulinemia, pero no los normoinsulinémicos, inducen UCP-2 en la aorta y esta proteína resulta tener un papel protector frente la acumulación lipídica. Varias evidencias apoyan este papel protector de las UCPs. Así, la falta de UCP-2 en macrófagos, acelera la progresión de la placa aterosclerótica [Blanc y col., 2003]. Además, UCP-2 podría modificar el proceso aterosclerótico debido a que altos niveles de esta proteína reducen la expresión de PAI-1 y los niveles de ROS, además de la proliferación y la migración de CMLV [Park, J. Y. y col., 2005].

Finalmente, uno de los mecanismos implicados en la expresión diferencial de UCPs en ambos grupos de BATIRKO obesos podría deberse a las diferencias en la concentración circulatoria de TNF- α . Se ha descrito previamente que TNF- α podría regular directamente la expresión de UCP-2 en adipocitos, provocando un descenso de la expresión de dicha proteína desacoplante [Moukdar y col., 2009]. De hecho, nosotros hemos demostrado por primera vez que TNF- α disminuyó significativamente la expresión de UCP-2 inducida por los ácidos grasos en células de músculo liso vascular. Estos datos sugieren que la elevación de TNF- α en la aorta disminuye la expresión de UCP-2 y conduce a una acumulación de lípidos y a un mayor daño vascular, como observamos en el grupo normoinsulinémico respecto al hiperinsulinémico.

En conclusión, nuestros resultados demuestran que los ratones BATIRKO obesos y normoinsulinémicos que no compensan la resistencia a la insulina, mostraron una peor señalización de insulina en el tejido adiposo blanco, concentraciones elevadas de TNF- α y reducidas de adiponectina en ambos tejidos adiposos y en plasma, elevados niveles de TNF- α y ROS y bajos niveles de expresión de UCP-2 en la aorta. Esta secuencia de eventos conduce a una acumulación de lípidos y a un daño vascular caracterizado por una disfunción endotelial, un incremento del área de lesión y del infiltrado de macrófagos en el arco aórtico. Además, se observó un aumento significativo de la expresión de varios marcadores de daño vascular como MCP-1 y PAI-1. Sin embargo, el grupo hiperinsulinémico que compensó la resistencia a la insulina restauró la señalización de insulina en el WAT, disminuyó TNF- α y elevó la adiponectina en ambos tejidos adiposos, disminuyó la producción de TNF- α y ROS y aumentó la expresión de UCP-2 en la aorta. Estos hechos conducen a una menor acumulación lipídica y a un menor daño vascular. Principalmente, nuestros resultados sugieren la existencia de un mecanismo de unión entre el fallo de los mecanismos compensatorios de la resistencia a la insulina, la regulación al alza de TNF- α , la disminución de la expresión de UCP-2, la acumulación de lípidos y la alta expresión de factores de riesgo vascular en la aorta, para finalmente, provocar mayor daño vascular. Sin embargo, si estos mecanismos compensatorios en respuesta a la insulina se ponen en marcha, se produce una prevención del daño macrovascular (Figura 78).

COMPENSACIÓN DE LA RESISTENCIA A LA INSULINA
BATIRKO obeso con hiperinsulinemia moderada (B HFD H)



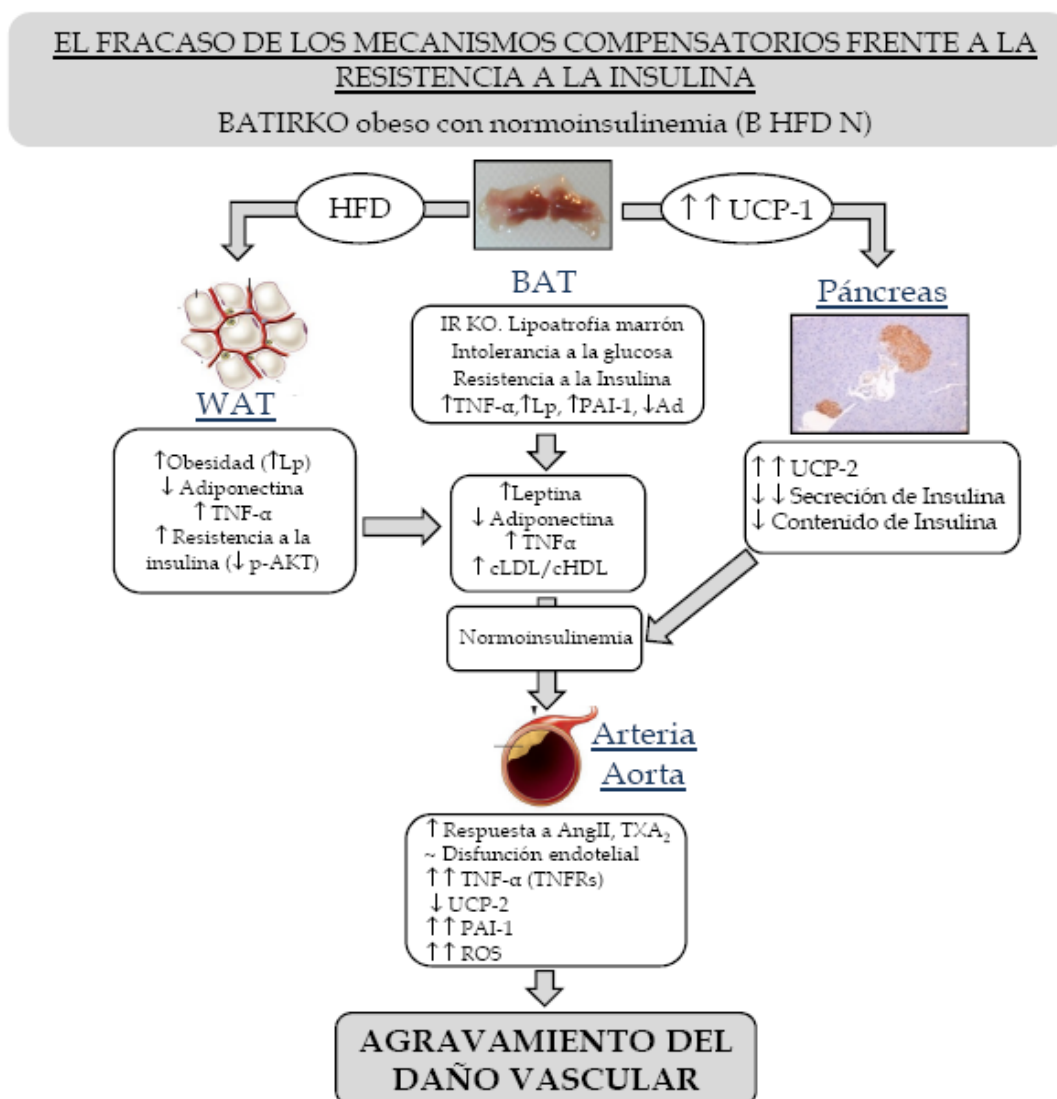


Figura 78. Esquemas del papel de los mecanismos compensatorios frente a la resistencia a la insulina en el modelo BATIRKO obeso. En el primer esquema, podemos observar los mecanismos que se desarrollan cuando se produce una compensación frente a la resistencia a la insulina con una hiperinsulinemia moderada como ocurre en BATIRKO obeso H. En la parte inferior de la figura, podemos observar los mecanismos que se desarrollan cuando los mecanismos compensatorios frente a la resistencia a la insulina fracasan como sucede en BATIRKO obeso normoinsulinémico.

2. PAPEL DEL TEJIDO ADIPOSO MARRÓN EN LA ENFERMEDAD VASCULAR ASOCIADO AL ENVEJECIMIENTO

Como ya hemos explicado anteriormente, el ratón BATIRKO presenta una lipoatrofia marrón severa debido a la delección específica del receptor de insulina en el tejido adiposo marrón. Este hecho por sí mismo confiere susceptibilidad a la obesidad en el ratón y recientemente, se ha puesto de relevancia que el tejido adiposo marrón tiene una correlación inversa con el índice de masa corporal, especialmente en adultos humanos de edad avanzada [Lowell y col., 1993; Cypess y col., 2009].

En este sentido, la lipoatrofia marrón severa observada en nuestro modelo, fue suficiente para inducir el desarrollo de la obesidad sumado al efecto del envejecimiento. Esta obesidad se caracterizó por un aumento del peso corporal, un incremento de la adiposidad y niveles elevados circulantes de leptina. Además, los ratones BATIRKO evolucionaron hacia una intolerancia progresiva a la glucosa para desarrollar finalmente una hiperglucemia en el ayuno, sin presentar una resistencia a la insulina global. De hecho, esta alteración en la homeostasis de la glucosa podría estar relacionada con el defecto de la secreción de insulina intrínseca del propio genotipo del animal. En este sentido, observamos que el ratón BATIRKO mostró hipoinsulinemia, hipoplasia pancreática y un defecto severo en la secreción aguda de insulina. Se ha descrito que UCP-2 desempeña un papel negativo en la secreción de insulina en las células β del páncreas [Blanc y col., 2003; Moukdar y col., 2009] y nosotros hemos encontrado una correlación positiva y significativa entre la expresión de UCP-1 en el BAT y de UCP-2 en el islote pancreático, que parece sugerir que el aumento en la expresión de ambos marcadores termogénicos está implicado en el mecanismo compensatorio de la lipoatrofia marrón y en la pérdida del gasto de energía observado en los ratones BATIRKO.

Debido a su propio genotipo, los ratones BATIRKO de todas las edades estudiadas presentaron una resistencia primaria a la acción de la insulina en el tejido adiposo marrón. En cambio, cuando estudiamos la respuesta *in vivo* en otros tejidos, encontramos que todos los ratones jóvenes presentaban sensibilidad a la insulina, de manera que esa resistencia a la insulina primaria en un tejido minoritario, no alteraba la sensibilidad a la insulina global. Sin embargo, a medida que el ratón envejecía, se observó un descenso de la señalización de la insulina en el tejido adiposo blanco del ratón BATIRKO de mayor edad. Y este descenso en la señalización estaba relacionado con el aumento de la adiposidad observada en este grupo de animales envejecidos. Al

mismo tiempo, también pudimos observar que el ratón BATIRKO de mayor edad, tenía una peor respuesta a la acción de la insulina en la arteria aorta, en lo que respecta a la fosforilación de Akt y eNOS. Además, cuando estudiamos la relajación en respuesta a la insulina en anillos aórticos previamente contraídos, observamos que los ratones BATIRKO de mayor edad sufrían un descenso significativo de dicha relajación causada por la insulina. Todos estos resultados, parecen sugerir de manera clara, que el ratón BATIRKO sometido a un proceso de envejecimiento y que mostraba resistencia a la insulina primaria en el BAT, desarrollaba obesidad y sufría un fallo en la señalización de la insulina en el tejido adiposo blanco, también desarrollaba resistencia a la insulina vascular.

En este sentido, está descrita la existencia de una relación entre la obesidad y la resistencia a la insulina [Boden 2001]. Sin embargo, el mecanismo exacto por el que la obesidad causa resistencia a la insulina, sigue sin estar claro. Una de las teorías en boga actualmente, es el papel que representa la inflamación en la diabetes tipo 2 y por tanto, en la resistencia a la insulina previa. De hecho, la obesidad es una enfermedad inflamatoria [Shoelson y col., 2006] y podría ser uno de los mecanismos implicados en la resistencia vascular a la insulina observados en el ratón BATIRKO viejo. A este respecto, nuestro ratón BATIRKO de mayor edad presentó un incremento significativo de moléculas proinflamatorias o adipoquinas como son TNF- α , PAI-1 y leptina tanto en el tejido adiposo marrón como en el blanco. Estos cambios también se reflejaron en la circulación sanguínea, de manera que hallamos altas concentraciones en plasma de leptina y TNF- α . Más importante aún, es el hecho de que el ratón BATIRKO de mayor edad mostró mayor infiltrado de macrófagos en los arcos aórticos y un aumento significativo de la expresión de moléculas proinflamatorias como iNOS, TNF- α , los receptores de TNF- α (TNFR-1 y TNFR-2), MCP-1 y PAI-1 en la arteria aorta. El aumento de estas moléculas proinflamatorias podría explicar la disfunción vascular observada en el BATIRKO de mayor edad. Además de la inflamación en la aorta, el ratón BATIRKO envejecido mostró un aumento significativo de la expresión de ARNm de ICAM-1 y ET-1 en la arteria aorta y una menor respuesta a la acetilcolina en los anillos aórticos, lo que quiere decir que, nuestro modelo BATIRKO de envejecimiento presentó activación de las células endoteliales y disfunción endotelial. En este sentido, se ha descrito que las alteraciones en la reactividad vascular y en los marcadores bioquímicos de la activación de las células endoteliales aparecen de forma temprana en pacientes con estados prediabéticos [Caballero y col., 1999]. Más aún, la disfunción

endotelial es un factor determinante de la reactividad vascular alterada y desempeña un papel principal en la génesis de complicaciones micro- y macrovasculares [Caballero y col., 1999; Hsueh y col., 2004].

De manera interesante, observamos que en la aorta de los BATIRKO de mayor edad, se produce un aumento de la expresión del ARNm de eNOS, posiblemente como un mecanismo compensatorio contra el daño endotelial. En la literatura, podemos encontrar que la expresión de eNOS aumenta o disminuye en respuesta a una gran variedad de condiciones adversas. Así, se ha demostrado que en respuesta a condiciones desfavorables como hipercolesterolemia [Kanazawa y col., 1996], tabaquismo [Barua y col., 2003] o hipertensión en animales jóvenes [Li, H. y col., 2002], la expresión de eNOS está aumentada. En cambio, en los vasos sanguíneos de pacientes con aterosclerosis avanzada, la expresión de eNOS se ve disminuida [Oemar y col., 1998].

De hecho, está establecido que la producción de ROS en el endotelio representa un importante papel en el desarrollo de la disfunción endotelial. Nuestros datos demuestran que el BATIRKO envejecido que muestra disfunción endotelial tiene altos niveles de anión superóxido y de nitro-tirosina en los arcos aórticos. Estos resultados sugieren que ROS y RNS podrían ser uno de los mecanismos implicados en la disfunción vascular observada en el BATIRKO de mayor edad. Por consiguiente, el ratón BATIRKO de 52 semanas así como el ratón IRKO [Duncan y col., 2007] podrían regular al alza la expresión de eNOS, compensando potencialmente el secuestro de NO por ROS. Por otro lado, los altos niveles de ROS podrían deberse a un desequilibrio entre la expresión de los enzimas oxidantes y antioxidantes. Así, el ratón BATIRKO de 52 semanas mostró un incremento significativo de la expresión de ARNm del enzima oxidante NOX-4 y un descenso significativo de la expresión de ARNm de enzimas antioxidantes como SOD-2, Gpx-1 y Gpx-4. La SOD-2 es una enzima antioxidante cuya actividad es dependiente de manganeso y protege contra el estrés oxidativo y la disfunción endotelial durante el envejecimiento [Lund y col., 2009] y también en arterias de ratones ApoE^{-/-} [Ohashi y col., 2006]. La disfunción endotelial y la superproducción de ROS activan una gran variedad de rutas proinflamatorias. En este sentido, el ratón BATIRKO de 52 semanas mostró infiltración de macrófagos en los arcos aórticos y un incremento significativo de genes proinflamatorios en la aorta, tal y como se ha discutido anteriormente.

En conclusión, el presente estudio apoya el concepto de que la lipoatrofia marrón es suficiente para conferir susceptibilidad a la obesidad durante el envejecimiento. Así, la lipoatrofia de la grasa marrón y la obesidad disparan una secuencia de eventos como son la elevación de moléculas proinflamatorias en ambos tejidos adiposos, la resistencia vascular a la insulina y un descenso significativo en la relajación en respuesta a la insulina en la aorta, una alta expresión de marcadores proinflamatorios y de activación endotelial en la aorta, disfunción vascular y finalmente, estrés oxidativo en ratones BATIRKO en proceso de envejecimiento (Figura 79). En conjunto, nuestros resultados sugieren una relación entre la resistencia a la insulina vascular, la disfunción vascular y el estrés oxidativo.

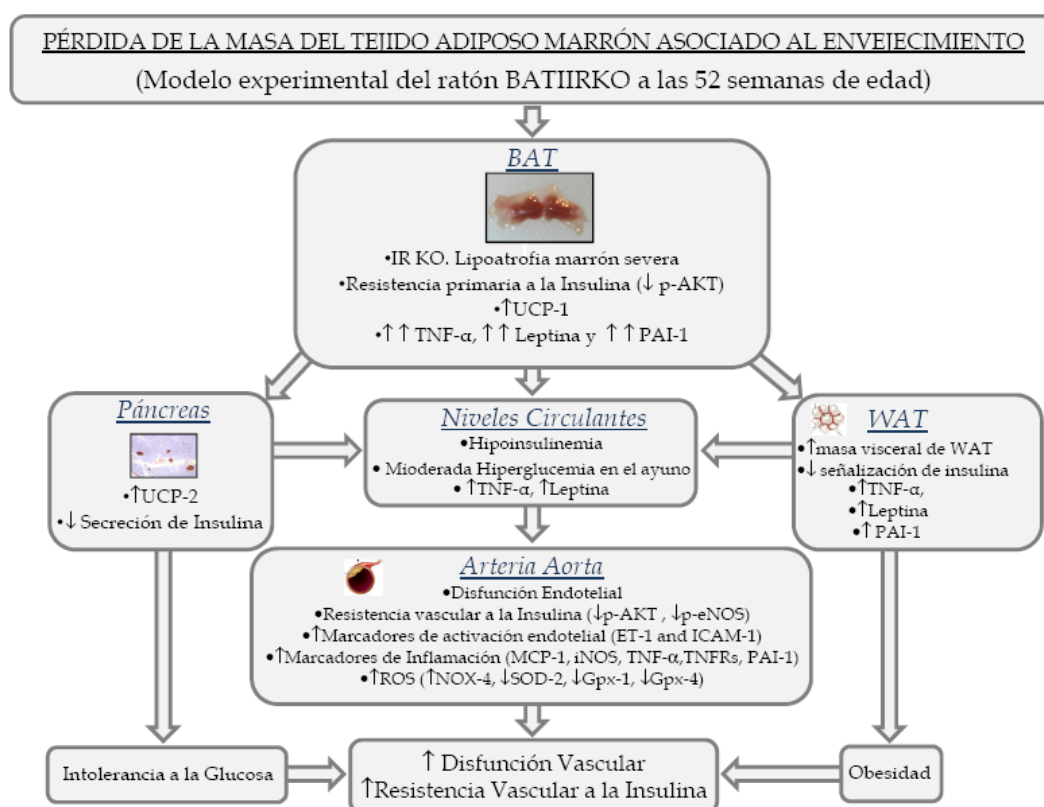


Figura 79. Esquema del papel del tejido adiposo marrón en la función vascular y en el metabolismo de la glucosa de BATIRKO en proceso de envejecimiento.

3. METABOLISMO DIFERENCIAL DE LOS ÁCIDOS GRASOS Y DE LA GLUCOSA EN DOS MODELOS CELULARES CARDIOVASCULARES

En un corazón adulto sano, bajo condiciones aeróbicas, la mayoría de la energía requerida para una función cardiaca normal deriva de los ácidos grasos, mientras sólo un 30% se obtiene principalmente a través del metabolismo de la glucosa [Stanley y col., 2005; An y Rodrigues 2006].

Durante el período fetal y neonatal, hasta que se realiza el cambio a un metabolismo adulto, el corazón y por tanto los cardiomiocitos, tienen principalmente un metabolismo glucídico [Hocquette y col., 2006].

En las líneas celulares de cardiomiocitos obtenidas en este trabajo, se observa que hay una respuesta en la señalización de la insulina inducida tanto a concentraciones fisiológicas como suprafisiológicas de dicha hormona, siendo estas células sensibles a la acción de la insulina. Por otro lado, es objeto de controversia si la insulina a concentraciones fisiológicas tiene un efecto directo en las células de músculo liso vascular. De hecho, estudios recientes describen que la insulina no es capaz de inducir su señalización en células de músculo liso de aorta de seres humanos [Chisalita y col., 2009]. Sin embargo, en las líneas celulares de músculo liso vascular de aorta de ratón adulto utilizadas en este trabajo, demostramos que son sensibles a la acción de la insulina, ya que se activa la señalización de dicha hormona, y además son capaces de captar glucosa en respuesta a la insulina a concentraciones fisiológicas, siendo mayor el efecto a concentraciones de insulina suprafisiológicas.

El otro punto que abordamos en los modelos celulares, es el efecto de los ácidos grasos representados por el ácido oleico y el ácido palmítico. Se observa que en ambos tipos celulares se pone en marcha el metabolismo oxidativo en respuesta a los dos ácidos grasos, aunque se obtuvo mayor activación cuando se utilizó el ácido oleico.

En los primeros estudios del sustrato metabólico del corazón humano, en los que se incluyeron pacientes diabéticos, ya se observó que en ellos se producía un descenso de la asimilación de glucosa, mientras que la asimilación de ácidos grasos aumentaba [Ungar y col., 1955]. Esta situación podría relacionarse con el hecho de que la quinasa dependiente de AMP cíclico (AMPK) sufra un descenso de la relación forma activa/inactiva; de manera que, a medida que vaya aumentando su forma inactiva, dejará de ejercer su efecto inhibitor sobre la Acetil-CoA carboxilasa (ACC). Sin

embargo, ACC se mantiene fosforilada e inactiva a lo largo del tiempo, a altas concentraciones de ácidos grasos, lo cual sugiere una inactivación de ACC independiente de AMPK. Ello, supondría mantener inactiva ACC y por tanto, aumentado el acceso de los ácidos grasos a la mitocondria y su consiguiente oxidación.

Se sabe que los ácidos grasos empeoran la asimilación de glucosa mediada por insulina. De hecho, se ha mostrado de forma repetida y consistente que la alimentación alta en grasas empeora la tolerancia a la glucosa y desciende la sensibilidad a la acción de la insulina en el músculo [Chun y col., 2010; Kim, J. Y. y col., 2000; Storlien y col., 1986], aunque el mecanismo exacto por el que los ácidos grasos inhiben la acción de la insulina todavía es desconocido. Existen estudios que sugieren un papel de varias isoformas de la proteína quinasa C (PKC), especialmente de PKC θ y PKC ϵ [Itani y col., 2000]. Estas quinasas podrían activarse de dos formas, o bien directamente debido a la alta generación de diacilglicerol, o indirectamente por un incremento de las concentraciones de acil-CoA de cadena larga. Este incremento del acil-CoA estaría causado por un desequilibrio de las tasas de disponibilidad y/o asimilación de los ácidos grasos y la β -oxidación de los mismos. La relación de ácidos grasos y de la actividad PKC ha sido observada en músculo esquelético resistente a la acción de la insulina de rata [Laybutt y col., 1999].

Otros estudios realizados recientemente sugieren que los ácidos grasos también inhiben la señalización de la insulina a la altura de Akt/PKB, posiblemente vía ceramida [Schmitz-Peiffer y col., 1999]. Sin embargo, en nuestros modelos celulares, el tratamiento con ácidos grasos, ya sea agudo o crónico, no evita la activación de Akt en presencia de insulina, aunque en las CMLV se observa un ligero descenso de dicha activación tras un tratamiento crónico con el ácido palmítico. Pero, fundamentalmente, la respuesta que se observa en los cardiomiocitos es una activación de Akt en presencia de insulina. Esta quinasa ejerce un efecto inhibitorio sobre AMPK. En cardiomiocitos neonatales de rata se ha descrito que este efecto puede realizarse a través de la fosforilación directa de Akt en el residuo serina 485 de AMPK [Soltys y col., 2006], aunque también podría deberse a una acción indirecta de Akt sobre las quinasas que activan AMPK, si bien esta acción es solo una conjetura.

Por otro lado, en las células de músculo liso vascular, no se aprecia el efecto contrapuesto de Akt y AMPK, si no que se mantienen ambas activaciones de forma independiente. En principio, la señalización de insulina (principalmente anabólica) debería ser contraria a la activación de AMPK inducida por los ácidos grasos, que pone

en marcha rutas catabólicas. Sin embargo, se ha descrito que bajo diversos estímulos antioxidantes, ambas rutas de señalización pueden estar activas y cooperar, aumentando la sensibilidad a la insulina y el transporte de glucosa [Kang y Kim, 2010]. Por otro lado, en un modelo animal de obesidad inducida mediante “dieta de cafetería” (dieta baja en grasas pero de gran palatabilidad, lo que induce la hiperfagia) se ha observado que aunque la fosforilación de Akt en el residuo serina 473 disminuía, el resto de la ruta de señalización de la insulina y la activación de AMPK no se veían alteradas, incluidas la fosforilación de Akt en el residuo treonina 308 (activación producida por PDK-1) y de AMPK en la treonina 172 (activación a través de LKB-1) [Brandt y col., 2010]. Y es posible que esto sea lo que esté ocurriendo en las células de músculo liso vascular utilizadas en este trabajo. El ácido oleico, ácido graso de cadena larga y monoinsaturado, no produce resistencia a la insulina, o por lo menos dicha resistencia a la insulina no ocurre a través de un fallo en la señalización de Akt. Otro papel que se ha atribuido al ácido oleico, y no al ácido palmítico, es su capacidad para inducir la proliferación de las células de músculo liso vascular de origen humano [Lamers y col., 2010] o de rata [Yun y col., 2006], a través de la fosforilación de Akt, siendo dependiente de la vía PI3K. De este modo, otra posible explicación de que ambas rutas estén activas en las CMLV utilizadas en este trabajo, puede ser que realicen una función sinérgica en la proliferación de dichas células.

Otra de las acciones biológicas de la insulina estudiada en ambos tipos celulares fue el transporte de glucosa. En las células de músculo liso vascular, observamos que el transporte de glucosa fue insulino-dependiente a dosis fisiológicas y a concentraciones mayores como se describe en trabajos previos realizados en CMLV de rata [Izawa y col., 2005], a través de la translocación de GLUT-4 a la membrana plasmática. Además, observamos que esta acción de la insulina se realiza prioritariamente a través de la isoforma A del receptor de la insulina como ya se ha descrito en otras líneas celulares como hepatocitos neonatales y células β pancreáticas [Gonzalez-Rodriguez y col., 2008; Escribano y col., 2009].

En cardiomiocitos, observamos que el transporte de glucosa inducido tanto por la insulina como por el ácido oleico podría verse minimizado por el alto transporte basal encontrado. Surge la pregunta ¿por qué existe esa alta captación de glucosa en el estado basal? La respuesta podría estar en el balance de los transportadores de la glucosa, dado que el análisis de la cascada de señalización intracelular de la insulina no sugería posibles cambios en la sensibilidad a la acción de la hormona. Si el ratio GLUT-

1/GLUT-4 se ve desplazado hacia el primero, causaría que el transporte se viera facilitado de forma independiente de insulina y por ello, al estimular con la hormona, la cantidad de GLUT-4 disponible para el transporte sería tan baja que apenas repercutiría en el transporte inespecífico de GLUT-1. De la misma manera, no se vería afectado por los inhibidores de PI3K. El hecho de que GLUT-1 esté aumentado se explica porque es el principal transportador de la insulina en el corazón embrionario, aunque poco después del nacimiento ocurre un cambio de expresión, disminuyendo las concentraciones de GLUT-1 y aumentando las de GLUT-4. Además, en todo caso el GLUT-1 es un transportador muy importante en el corazón neonatal [Smoak y Branch 2000].

Otra posible explicación es que falle la translocación de GLUT-4 a la membrana plasmática y por ello, aunque las concentraciones de GLUT-1 sean altas y el transporte basal sea también alto, el hecho de que GLUT-4 no se transloque a la membrana plasmática haría que no se produjese la captación de glucosa.

La tercera posibilidad es que a pesar de ser cardiomiocitos neonatales y en principio su metabolismo sea glucídico, puede que una parte muy importante de la obtención de energía se produzca a través de las enzimas β -oxidativas, cuya regulación corre a cargo de AMPK. Las biguanidas (fármacos antidiabéticos) disminuyen las concentraciones de glucosa corporal mediante el descenso de la producción hepática del metabolito y el aumento de la disponibilidad del mismo en el músculo. Parte de estos efectos metabólicos los realizan a través de la activación de AMPK. En un estudio realizado en cardiomiocitos, se describió que las biguanidas (a través de AMPK) y la insulina indujeron un transporte de glucosa comparable y que estos efectos eran inhibidos por LY 294002, siendo PI3 quinasa-dependientes. Además, en ausencia de insulina, AMPK tendría un efecto aditivo con la activación de Akt [Bertrand y col., 2006]. Esto podría explicar que en nuestras células no haya un transporte de glucosa mayor en presencia de insulina, ni en presencia de oleico, ya que, debido a la pequeña cantidad de GLUT-4 presente, quizás sería necesaria una labor conjunta de ambas rutas. Pero como hemos señalado anteriormente, en nuestro modelo celular de cardiomiocitos, Akt inhibe a AMPK. Por tanto los estímulos de insulina y ácido oleico conjuntos tendrían un efecto contrario, mientras que la activación de cada una de las rutas por separado no sería suficiente para inducir el transporte.

En conclusión, tanto los cardiomiocitos como las CMLV son sensibles a las acción de la insulina, presentando activación de la ruta de señalización intracelular de

dicha hormona en respuesta a un estímulo. Además, al estimular ambos modelos cardiovasculares con ácidos grasos, saturados o insaturados, se activa AMPK y se pondría en marcha el metabolismo β -oxidativo. Sin embargo, ninguno de los dos modelos celulares presenta resistencia a la insulina tras un tratamiento agudo o crónico con ácidos grasos, por lo menos respecto a la fosforilación de Akt. Serían necesarios más estudios para llegar a conocer los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de resistencia a la insulina en el corazón y en la arteria aorta.

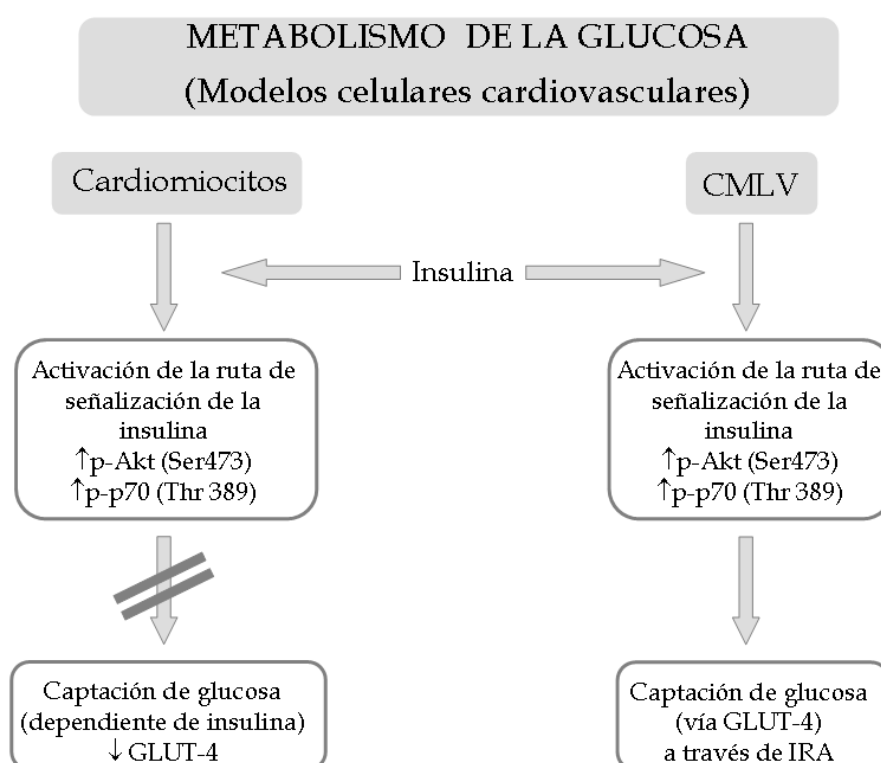


Figura 80. Esquema del metabolismo de la glucosa en dos modelos celulares cardiovasculares. A pesar de la existencia de una activación de la ruta de señalización de la insulina en cardiomiocitos y en CMLV, sólo las células de músculo liso de aorta son capaces de captar glucosa, principalmente a través de la isoforma A del receptor de la insulina.

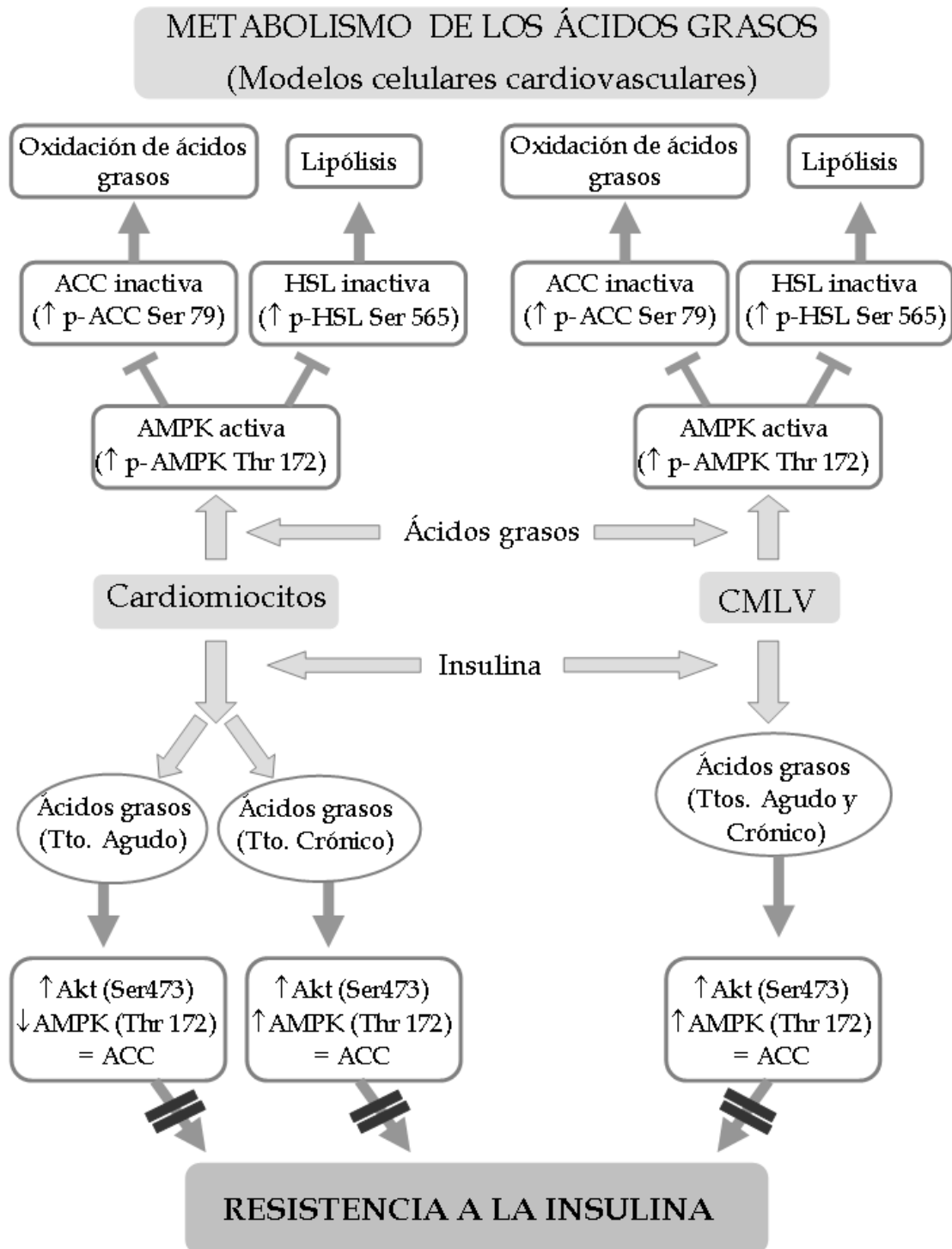


Figura 81. Metabolismo de los ácidos grasos en dos modelos celulares cardiovasculares. El pretratamiento con ácidos grasos no induce resistencia a la insulina en ninguno de los dos modelos celulares, si bien la respuesta de cardiomiocitos a un tratamiento agudo es distinta al resto de respuestas encontradas.

Conclusiones

En base a los objetivos planteados y a los resultados obtenidos en este trabajo, podemos llegar a las siguientes conclusiones:

- 1- El fallo de los mecanismos compensatorios frente a la resistencia a la insulina inducida por obesidad provoca un aumento de citoadipoquinas proinflamatorias, marcadores de daño vascular y especies reactivas de oxígeno y un descenso de UCP-2, que finalmente causan acumulación lipídica y daño vascular. Por tanto, el fracaso de los mecanismos frente a la resistencia a la insulina agrava el daño vascular asociado a obesidad.
- 2- El desarrollo de los mecanismos compensatorios frente a la resistencia a la insulina inducida por obesidad, como puede ser una hiperinsulinemia moderada, restaura la señalización de insulina en el tejido adiposo blanco que conlleva a una menor inflamación local y sistémica, niveles más elevados de UCP-2, y en consecuencia, una menor acumulación lipídica y un menor daño vascular. Por tanto, el desarrollo de dichos mecanismos compensatorios tendría una acción protectora frente al daño vascular asociado a obesidad.
- 3- UCP-2 ejerce un papel protector frente a la acumulación lipídica, las especies reactivas de oxígeno y el daño vascular. De esta manera, un aumento TNF- α , a nivel sistémico y en la aorta, podría disminuir la expresión de UCP-2 y agravar el daño vascular, como ocurre en situaciones de obesidad y resistencia a la insulina. De hecho, TNF- α inhibe la expresión de UCP-2 inducida por ácidos grasos en células endoteliales y en células de músculo liso vascular.
- 4- La lipoatrofia marrón severa confiere susceptibilidad a la obesidad y ambos fenómenos asociados con el proceso de envejecimiento son suficientes para inducir resistencia a la insulina vascular, disfunción vascular, inflamación y estrés oxidativo en la arteria aorta.
- 5- Los cardiomiocitos neonatales tienen un transporte de glucosa insulino-independiente debido a una disminución de la expresión del transportador Glut-4. Por el contrario, las células de músculo liso vascular tienen un

transporte de glucosa insulino-dependiente a través de la isoforma A del receptor de la insulina.

- 6- La exposición de cardiomiocitos neonatales y de células de músculo liso vascular adultas a ácidos grasos saturados o insaturados provoca la activación de AMPK, que modula la inhibición de algunas de sus dianas, como son ACC y HSL, independientemente de la dosis utilizada.
- 7- El pretratamiento agudo o crónico de ácidos grasos en ambos modelos celulares cardiovasculares, no causa resistencia a la insulina, en lo que a la fosforilación de Akt se refiere.
- 8- La activación de Akt en respuesta a la insulina provoca un descenso en la activación de AMPK causada por los ácidos grasos en cardiomiocitos, pero no en células de músculo liso aórtico.

Conclusión final

El modelo BATIRKO nos ha permitido establecer que la lipoatrofia marrón severa confiere susceptibilidad a la obesidad frente a la dieta grasa o asociada al proceso de envejecimiento. Esta obesidad provoca resistencia a la insulina y conduce a un daño vascular, en el que también está implicado el desarrollo o no de los mecanismos compensatorios frente a dicha resistencia a la insulina. Para desarrollar la resistencia a la insulina y el daño vascular es necesario que se genere un proceso inflamatorio y estrés oxidativo, ya que los ácidos grasos por sí mismos no son suficientes para provocar un fallo en la señalización de insulina, al menos en las células cardiovasculares.

Bibliografía

- (1993). "The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group." N Engl J Med **329**(14): 977-86.
- (1998). "Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group." Lancet **352**(9131): 837-53.
- Accili, D., J. Drago, et al. (1996). "Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene." Nat Genet **12**(1): 106-9.
- Aggoun, Y. (2007). "Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease." Pediatr Res **61**(6): 653-9.
- Akagiri, S., Y. Naito, et al. (2008). "A Mouse Model of Metabolic Syndrome; Increase in Visceral Adipose Tissue Precedes the Development of Fatty Liver and Insulin Resistance in High-Fat Diet-Fed Male KK/Ta Mice." J Clin Biochem Nutr **42**(2): 150-7.
- An, D. and B. Rodrigues (2006). "Role of changes in cardiac metabolism in development of diabetic cardiomyopathy." Am J Physiol Heart Circ Physiol **291**(4): H1489-506.
- Apovian, C. M., S. Bigornia, et al. (2008). "Adipose macrophage infiltration is associated with insulin resistance and vascular endothelial dysfunction in obese subjects." Arterioscler Thromb Vasc Biol **28**(9): 1654-9.
- Arch, J. R. (2002). "beta(3)-Adrenoceptor agonists: potential, pitfalls and progress." Eur J Pharmacol **440**(2-3): 99-107.
- Arend, W. P. and J. M. Dayer (1990). "Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **33**(3): 305-15.
- Asano, A., M. Morimatsu, et al. (1997). "Adrenergic activation of vascular endothelial growth factor mRNA expression in rat brown adipose tissue: implication in cold-induced angiogenesis." Biochem J **328** (Pt 1): 179-83.
- Badimon, J. J., L. Badimon, et al. (1991). "Platelet deposition at high shear rates is enhanced by high plasma cholesterol levels. In vivo study in the rabbit model." Arterioscler Thromb **11**(2): 395-402.
- Banerji, M. A., J. Lebowitz, et al. (1997). "Relationship of visceral adipose tissue and glucose disposal is independent of sex in black NIDDM subjects." Am J Physiol **273**(2 Pt 1): E425-32.
- Barua, R. S., J. A. Ambrose, et al. (2003). "Reactive oxygen species are involved in smoking-induced dysfunction of nitric oxide biosynthesis and upregulation of endothelial nitric oxide synthase: an in vitro demonstration in human coronary artery endothelial cells." Circulation **107**(18): 2342-7.
- Barzilai, N. (1999). "Obesity: age-associated weight gain and the development of disease. An interview with Nir Barzilai. Interview by Marc E. Weksler." Geriatrics **54**(11): 57-8, 61-4.
- Belke, D. D., S. Betuing, et al. (2002). "Insulin signaling coordinately regulates cardiac size, metabolism, and contractile protein isoform expression." J Clin Invest **109**(5): 629-39.
- Bertrand, L., A. Ginion, et al. (2006). "AMPK activation restores the stimulation of glucose uptake in an in vitro model of insulin-resistant cardiomyocytes via the activation of protein kinase B." Am J Physiol Heart Circ Physiol **291**(1): H239-50.

- Bezaire, V., L. L. Spriet, et al. (2005). "Constitutive UCP3 overexpression at physiological levels increases mouse skeletal muscle capacity for fatty acid transport and oxidation." FASEB J **19**(8): 977-9.
- Bischoff, S. C., M. Krieger, et al. (1992). "Monocyte chemotactic protein 1 is a potent activator of human basophils." J Exp Med **175**(5): 1271-5.
- Bjorkerud, S. and B. Bjorkerud (1996). "Apoptosis is abundant in human atherosclerotic lesions, especially in inflammatory cells (macrophages and T cells), and may contribute to the accumulation of gruel and plaque instability." Am J Pathol **149**(2): 367-80.
- Blake, D. R., J. B. Meigs, et al. (2004). "Impaired glucose tolerance, but not impaired fasting glucose, is associated with increased levels of coronary heart disease risk factors: results from the Baltimore Longitudinal Study on Aging." Diabetes **53**(8): 2095-100.
- Blanc, J., M. C. Alves-Guerra, et al. (2003). "Protective role of uncoupling protein 2 in atherosclerosis." Circulation **107**(3): 388-90.
- Bluher, M., B. B. Kahn, et al. (2003). "Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue." Science **299**(5606): 572-4.
- Bluher, M., M. D. Michael, et al. (2002). "Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity-related glucose intolerance." Dev Cell **3**(1): 25-38.
- Bobik, A., A. Grooms, et al. (1990). "Growth factor activity of endothelin on vascular smooth muscle." Am J Physiol **258**(3 Pt 1): C408-15.
- Boden, G. (2001). "Free fatty acids-the link between obesity and insulin resistance." Endocr Pract **7**(1): 44-51.
- Boulanger, C. and T. F. Luscher (1990). "Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide." J Clin Invest **85**(2): 587-90.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Brandes, R. P., I. Fleming, et al. (2005). "Endothelial aging." Cardiovasc Res **66**(2): 286-94.
- Brandt, N., K. De Bock, et al. (2010) "Cafeteria diet-induced insulin resistance is not associated with decreased insulin signaling or AMPK activity and is alleviated by physical training in rats." Am J Physiol Endocrinol Metab **299**(2): E215-24.
- Brasier, A. R., A. Recinos, 3rd, et al. (2002). "Vascular inflammation and the renin-angiotensin system." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(8): 1257-66.
- Brasier, A. R., M. Jamaluddin, et al. (2000). "Angiotensin II induces gene transcription through cell-type-dependent effects on the nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) transcription factor." Mol Cell Biochem **212**(1-2): 155-69.
- Braunersreuther, V. and F. Mach (2006). "Leukocyte recruitment in atherosclerosis: potential targets for therapeutic approaches?" Cell Mol Life Sci **63**(18): 2079-88.
- Brito, N., M. Fonseca, et al. (2010) "Metabolic factors in obesity." J Pediatr Endocrinol Metab **23**(1-2): 97-100.
- Brooks, A. R., P. I. Leikes, et al. (2002). "Gene expression profiling of human aortic endothelial cells exposed to disturbed flow and steady laminar flow." Physiol Genomics **9**(1): 27-41.
- Brown, K. A., S. P. Didion, et al. (2007). "Effect of aging, MnSOD deficiency, and genetic background on endothelial function: evidence for MnSOD haploinsufficiency." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(9): 1941-6.

- Bruning, J. C., D. Gautam, et al. (2000). "Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction." *Science* **289**(5487): 2122-5.
- Bruning, J. C., J. Winnay, et al. (1997). "Development of a novel polygenic model of NIDDM in mice heterozygous for IR and IRS-1 null alleles." *Cell* **88**(4): 561-72.
- Burger, D. and J. M. Dayer (2002). "High-density lipoprotein-associated apolipoprotein A-I: the missing link between infection and chronic inflammation?" *Autoimmun Rev* **1**(1-2): 111-7.
- Burke, A. P. and R. Virmani (2007). "Pathophysiology of acute myocardial infarction." *Med Clin North Am* **91**(4): 553-72; ix.
- Busse, R. and A. Mulsch (1990). "Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin." *FEBS Lett* **265**(1-2): 133-6.
- Caballero, A. E., S. Arora, et al. (1999). "Microvascular and macrovascular reactivity is reduced in subjects at risk for type 2 diabetes." *Diabetes* **48**(9): 1856-62.
- Calabresi, L., G. Rossoni, et al. (2003). "High-density lipoproteins protect isolated rat hearts from ischemia-reperfusion injury by reducing cardiac tumor necrosis factor-alpha content and enhancing prostaglandin release." *Circ Res* **92**(3): 330-7.
- Carlos, T. M. and J. M. Harlan (1994). "Leukocyte-endothelial adhesion molecules." *Blood* **84**(7): 2068-101.
- Caro, J. F., M. K. Sinha, et al. (1987). "Insulin receptor kinase in human skeletal muscle from obese subjects with and without noninsulin dependent diabetes." *J Clin Invest* **79**(5): 1330-7.
- Cederberg, J., S. Basu, et al. (2001). "Increased rate of lipid peroxidation and protein carbonylation in experimental diabetic pregnancy." *Diabetologia* **44**(6): 766-74.
- Chan, C. B. and M. E. Harper (2006). "Uncoupling proteins: role in insulin resistance and insulin insufficiency." *Curr Diabetes Rev* **2**(3): 271-83.
- Chan, C. B., D. De Leo, et al. (2001). "Increased uncoupling protein-2 levels in beta-cells are associated with impaired glucose-stimulated insulin secretion: mechanism of action." *Diabetes* **50**(6): 1302-10.
- Chan, C. B., P. E. MacDonald, et al. (1999). "Overexpression of uncoupling protein 2 inhibits glucose-stimulated insulin secretion from rat islets." *Diabetes* **48**(7): 1482-6.
- Chang, A. M. and J. B. Halter (2003). "Aging and insulin secretion." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **284**(1): E7-12.
- Chatterjee, S. (1992). "Role of oxidized human plasma low density lipoproteins in atherosclerosis: effects on smooth muscle cell proliferation." *Mol Cell Biochem* **111**(1-2): 143-7.
- Chen, L. Y., P. Mehta, et al. (1996). "Oxidized LDL decreases L-arginine uptake and nitric oxide synthase protein expression in human platelets: relevance of the effect of oxidized LDL on platelet function." *Circulation* **93**(9): 1740-6.
- Chen, Y., R. C. Budd, et al. (2006). "Augmentation of proliferation of vascular smooth muscle cells by plasminogen activator inhibitor type 1." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**(8): 1777-83.
- Cheng, H. F., B. N. Becker, et al. (1995). "Angiotensin II upregulates type-1 angiotensin II receptors in renal proximal tubule." *J Clin Invest* **95**(5): 2012-9.
- Chisalita, S. I., G. S. Johansson, et al. (2009). "Human aortic smooth muscle cells are insulin resistant at the receptor level but sensitive to IGF1 and IGF2." *J Mol Endocrinol* **43**(6): 231-9.

- Cho, H., J. L. Thorvaldsen, et al. (2001). "Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice." J Biol Chem **276**(42): 38349-52.
- Chun, M. R., Y. J. Lee, et al. (2010) "Differential effects of high-carbohydrate and high-fat diet composition on muscle insulin resistance in rats." J Korean Med Sci **25**(7): 1053-9.
- Cinti, S. (2000). "Anatomy of the adipose organ." Eat Weight Disord **5**(3): 132-42.
- Cipollone, F., F. Chiarelli, et al. (2005). "Enhanced soluble CD40 ligand contributes to endothelial cell dysfunction in vitro and monocyte activation in patients with diabetes mellitus: effect of improved metabolic control." Diabetologia **48**(6): 1216-24.
- Cohn, J. N. and G. Tognoni (2001). "A randomized trial of the angiotensin-receptor blocker valsartan in chronic heart failure." N Engl J Med **345**(23): 1667-75.
- Colucci, M., J. A. Paramo, et al. (1986). "Inhibition of one-chain and two-chain forms of human tissue-type plasminogen activator by the fast-acting inhibitor of plasminogen activator in vitro and in vivo." J Lab Clin Med **108**(1): 53-9.
- Couffinhal, T., C. Duplaa, et al. (1994). "Regulation of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 in human vascular smooth muscle cells." Circ Res **74**(2): 225-34.
- Crockford, P. M., R. J. Harbeck, et al. (1966). "Influence of age on intravenous glucose tolerance and serum immunoreactive insulin." Lancet **1**(7435): 465-7.
- Crouse, J. R., 3rd (2006). "Thematic review series: patient-oriented research. Imaging atherosclerosis: state of the art." J Lipid Res **47**(8): 1677-99.
- Cruz-Garcia, L., A. Saera-Vila, et al. (2009). "Targets for TNFalpha-induced lipolysis in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) adipocytes isolated from lean and fat juvenile fish." J Exp Biol **212**(Pt 14): 2254-60.
- Csiszar, A., N. Labinskyy, et al. (2007). "Vascular superoxide and hydrogen peroxide production and oxidative stress resistance in two closely related rodent species with disparate longevity." Aging Cell **6**(6): 783-97.
- Cushing, S. D., J. A. Berliner, et al. (1990). "Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(13): 5134-8.
- Cybulsky, M. I. and M. A. Gimbrone, Jr. (1991). "Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis." Science **251**(4995): 788-91.
- Cypess, A. M., S. Lehman, et al. (2009). "Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans." N Engl J Med **360**(15): 1509-17.
- Daniel, T. O., H. Liu, et al. (1999). "Thromboxane A2 is a mediator of cyclooxygenase-2-dependent endothelial migration and angiogenesis." Cancer Res **59**(18): 4574-7.
- Dasari, A., J. N. Bartholomew, et al. (2006). "Oxidative stress induces premature senescence by stimulating caveolin-1 gene transcription through p38 mitogen-activated protein kinase/Sp1-mediated activation of two GC-rich promoter elements." Cancer Res **66**(22): 10805-14.
- Daugherty, A., D. L. Rateri, et al. (2004). "Hypercholesterolemia stimulates angiotensin peptide synthesis and contributes to atherosclerosis through the AT1A receptor." Circulation **110**(25): 3849-57.
- Daugherty, A., M. W. Manning, et al. (2000). "Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice." J Clin Invest **105**(11): 1605-12.

- Davidson, M. B. (1979). "The effect of aging on carbohydrate metabolism: a review of the English literature and a practical approach to the diagnosis of diabetes mellitus in the elderly." *Metabolism* **28**(6): 688-705.
- Davies, M. J., J. L. Gordon, et al. (1993). "The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis." *J Pathol* **171**(3): 223-9.
- Davignon, J. and P. Ganz (2004). "Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis." *Circulation* **109**(23 Suppl 1): III27-32.
- De Souza, C. T., A. L. Gasparetti, et al. (2003). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1-dependent uncoupling protein-2 expression in pancreatic islets of rats: a novel pathway for neural control of insulin secretion." *Diabetologia* **46**(11): 1522-31.
- De Souza, C. T., E. P. Araujo, et al. (2007). "Inhibition of UCP2 expression reverses diet-induced diabetes mellitus by effects on both insulin secretion and action." *FASEB J* **21**(4): 1153-63.
- DeFronzo, R. A. (1988). "Lilly lecture 1987. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM." *Diabetes* **37**(6): 667-87.
- Depre, C., J. L. Vanoverschelde, et al. (1999). "Glucose for the heart." *Circulation* **99**(4): 578-88.
- DeWitt, D. L. (1991). "Prostaglandin endoperoxide synthase: regulation of enzyme expression." *Biochim Biophys Acta* **1083**(2): 121-34.
- Di Massimo, C., R. Lo Presti, et al. (2006). "Impairment of plasma nitric oxide availability in senescent healthy individuals: apparent involvement of extracellular superoxide dismutase activity." *Clin Hemorheol Microcirc* **35**(1-2): 231-7.
- Diao, J., E. M. Allister, et al. (2008). "UCP2 is highly expressed in pancreatic alpha-cells and influences secretion and survival." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(33): 12057-62.
- Dong, Z. M., S. M. Chapman, et al. (1998). "The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis." *J Clin Invest* **102**(1): 145-52.
- Drew, B. G., S. J. Duffy, et al. (2009). "High-density lipoprotein modulates glucose metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus." *Circulation* **119**(15): 2103-11.
- Duff, G. W. (1994). "Cytokines and acute phase proteins in rheumatoid arthritis." *Scand J Rheumatol Suppl* **100**: 9-19.
- Duncan, E. R., S. J. Walker, et al. (2007). "Accelerated endothelial dysfunction in mild prediabetic insulin resistance: the early role of reactive oxygen species." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **293**(5): E1311-9.
- Duval, C., A. Negre-Salvayre, et al. (2002). "Increased reactive oxygen species production with antisense oligonucleotides directed against uncoupling protein 2 in murine endothelial cells." *Biochem Cell Biol* **80**(6): 757-64.
- Dzau, V. J. (2001). "Theodore Cooper Lecture: Tissue angiotensin and pathobiology of vascular disease: a unifying hypothesis." *Hypertension* **37**(4): 1047-52.
- Dzau, V. J. and R. Re (1994). "Tissue angiotensin system in cardiovascular medicine. A paradigm shift?" *Circulation* **89**(1): 493-8.
- Ebara, T., K. Conde, et al. (2000). "Delayed catabolism of apoB-48 lipoproteins due to decreased heparan sulfate proteoglycan production in diabetic mice." *J Clin Invest* **105**(12): 1807-18.

- Elchebly, M., P. Payette, et al. (1999). "Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene." Science **283**(5407): 1544-8.
- Emori, T., Y. Hirata, et al. (1991). "Cellular mechanism of endothelin-1 release by angiotensin and vasopressin." Hypertension **18**(2): 165-70.
- Emori, T., Y. Hirata, et al. (1993). "Cellular mechanism of natriuretic peptides-induced inhibition of endothelin-1 biosynthesis in rat endothelial cells." Endocrinology **133**(6): 2474-80.
- Emre, Y., C. Hurtaud, et al. (2007). "Role of uncoupling protein UCP2 in cell-mediated immunity: how macrophage-mediated insulinitis is accelerated in a model of autoimmune diabetes." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(48): 19085-90.
- Eriksson, E. E., X. Xie, et al. (2001). "Importance of primary capture and L-selectin-dependent secondary capture in leukocyte accumulation in inflammation and atherosclerosis in vivo." J Exp Med **194**(2): 205-18.
- Escribano, O., C. Guillen, et al. (2009). "Beta-Cell hyperplasia induced by hepatic insulin resistance: role of a liver-pancreas endocrine axis through insulin receptor A isoform." Diabetes **58**(4): 820-8.
- Falkenhahn, M., F. Franke, et al. (1995). "Cellular distribution of angiotensin-converting enzyme after myocardial infarction." Hypertension **25**(2): 219-26.
- Fantini, V. R., Q. Wang, et al. (2000). "Mice lacking insulin receptor substrate 4 exhibit mild defects in growth, reproduction, and glucose homeostasis." Am J Physiol Endocrinol Metab **278**(1): E127-33.
- Feldmann, H. M., V. Golozoubova, et al. (2009). "UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality." Cell Metab **9**(2): 203-9.
- Fernandez-Alfonso, M. S., P. A. Martorana, et al. (1997). "Early induction of angiotensin I-converting enzyme in rat carotid artery after balloon injury." Hypertension **30**(2 Pt 1): 272-7.
- Festa, A., R. D'Agostino, Jr., et al. (2002). "Elevated levels of acute-phase proteins and plasminogen activator inhibitor-1 predict the development of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study." Diabetes **51**(4): 1131-7.
- Festa, A., R. D'Agostino, Jr., et al. (2004). "Differences in insulin resistance in nondiabetic subjects with isolated impaired glucose tolerance or isolated impaired fasting glucose." Diabetes **53**(6): 1549-55.
- Fontaine, K. R., D. T. Redden, et al. (2003). "Years of life lost due to obesity." JAMA **289**(2): 187-93.
- Forstermann, U. and H. Kleinert (1995). "Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **352**(4): 351-64.
- Fruhbeck, G., J. Gomez-Ambrosi, et al. (2001). "The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation." Am J Physiol Endocrinol Metab **280**(6): E827-47.
- Fulton, D., J. P. Gratton, et al. (1999). "Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt." Nature **399**(6736): 597-601.
- Fuster, V., L. Badimon, et al. (1992). "The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1)." N Engl J Med **326**(4): 242-50.
- Garin, G. and B. C. Berk (2006). "Flow-mediated signaling modulates endothelial cell phenotype." Endothelium **13**(6): 375-84.

- Gaur, U. and B. B. Aggarwal (2003). "Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily." Biochem Pharmacol **66**(8): 1403-8.
- Gebara, O. C., M. A. Mittleman, et al. (1995). "Association between increased estrogen status and increased fibrinolytic potential in the Framingham Offspring Study." Circulation **91**(7): 1952-8.
- Gesta, S., Y. H. Tseng, et al. (2007). "Developmental origin of fat: tracking obesity to its source." Cell **131**(2): 242-56.
- Gnacinska, M., S. Malgorzewicz, et al. (2010) "Adipose tissue activity in relation to overweight or obesity." Endokrynol Pol **61**(2): 160-8.
- Goldfine, A. B., J. A. Beckman, et al. (2006). "Family history of diabetes is a major determinant of endothelial function." J Am Coll Cardiol **47**(12): 2456-61.
- Golfman, L. S., T. Hata, et al. (1993). "Role of endothelin in heart function in health and disease." Can J Cardiol **9**(7): 635-53.
- Golledge, J. and D. A. Siew (2008). "Identifying the carotid 'high risk' plaque: is it still a riddle wrapped up in an enigma?" Eur J Vasc Endovasc Surg **35**(1): 2-8.
- Gonzalez-Rodriguez, A., C. Nevado, et al. (2008). "PTP1B deficiency increases glucose uptake in neonatal hepatocytes: involvement of IRA/GLUT2 complexes." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **295**(2): G338-47.
- Griendling, K. K. and G. A. FitzGerald (2003). "Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS." Circulation **108**(16): 1912-6.
- Griendling, K. K., M. Ushio-Fukai, et al. (1997). "Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle. New concepts." Hypertension **29**(1 Pt 2): 366-73.
- Griffith, O. W. and D. J. Stuehr (1995). "Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism." Annu Rev Physiol **57**: 707-36.
- Guerra, C., P. Navarro, et al. (2001). "Brown adipose tissue-specific insulin receptor knockout shows diabetic phenotype without insulin resistance." J Clin Invest **108**(8): 1205-13.
- Guillam, M. T., E. Hummler, et al. (1997). "Early diabetes and abnormal postnatal pancreatic islet development in mice lacking Glut-2." Nat Genet **17**(3): 327-30.
- Haffner, S. and H. Taegtmeier (2003). "Epidemic obesity and the metabolic syndrome." Circulation **108**(13): 1541-5.
- Haffner, S. M., S. Lehto, et al. (1998). "Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction." N Engl J Med **339**(4): 229-34.
- Hamberg, M., J. Svensson, et al. (1975). "Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(8): 2994-8.
- Han, D. K., C. C. Haudenschild, et al. (1995). "Evidence for apoptosis in human atherogenesis and in a rat vascular injury model." Am J Pathol **147**(2): 267-77.
- Harrison, D. G. (1997). "Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction." J Clin Invest **100**(9): 2153-7.
- Harrison, D., K. K. Griendling, et al. (2003). "Role of oxidative stress in atherosclerosis." Am J Cardiol **91**(3A): 7A-11A.
- Hector, J., B. Schwarzloh, et al. (2007). "TNF-alpha alters visfatin and adiponectin levels in human fat." Horm Metab Res **39**(4): 250-5.
- Hernandez-Presa, M., C. Bustos, et al. (1997). "Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents arterial nuclear factor-kappa B activation, monocyte

- chemoattractant protein-1 expression, and macrophage infiltration in a rabbit model of early accelerated atherosclerosis." Circulation **95**(6): 1532-41.
- Hesselink, M. K., M. Mensink, et al. (2003). "Human uncoupling protein-3 and obesity: an update." Obes Res **11**(12): 1429-43.
- Hirata, Y., H. Yoshimi, et al. (1988). "Cellular mechanism of action by a novel vasoconstrictor endothelin in cultured rat vascular smooth muscle cells." Biochem Biophys Res Commun **154**(3): 868-75.
- Hisamoto, K., M. Ohmichi, et al. (2001). "Estrogen induces the Akt-dependent activation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells." J Biol Chem **276**(5): 3459-67.
- Hoag, S., J. A. Marshall, et al. (1995). "High fasting insulin levels associated with lower rates of weight gain in persons with normal glucose tolerance: the San Luis Valley Diabetes Study." Int J Obes Relat Metab Disord **19**(3): 175-80.
- Hocquette, J. F., H. Sauerwein, et al. (2006). "Prenatal developmental changes in glucose transporters, intermediary metabolism and hormonal receptors related to the IGF/insulin-glucose axis in the heart and adipose tissue of bovines." Reprod Nutr Dev **46**(3): 257-72.
- Hotamisligil, G. S., D. L. Murray, et al. (1994). "Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(11): 4854-8.
- Hsueh, W. A., C. J. Lyon, et al. (2004). "Insulin resistance and the endothelium." Am J Med **117**(2): 109-17.
- Huo, Y. and K. Ley (2001). "Adhesion molecules and atherogenesis." Acta Physiologica Scand **173**(1): 35-43.
- Hynes, R. O. (2002). "Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines." Cell **110**(6): 673-87.
- Ingelsson, E., M. J. Pencina, et al. (2007). "Multimarker approach to evaluate the incidence of the metabolic syndrome and longitudinal changes in metabolic risk factors: the Framingham Offspring Study." Circulation **116**(9): 984-92.
- Inoue, A., M. Yanagisawa, et al. (1989). "The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(8): 2863-7.
- Inui, A. (1999). "Feeding and body-weight regulation by hypothalamic neuropeptides--mediation of the actions of leptin." Trends Neurosci **22**(2): 62-7.
- Ishizuka, T., M. Kawakami, et al. (1998). "Stimulation with thromboxane A2 (TXA2) receptor agonist enhances ICAM-1, VCAM-1 or ELAM-1 expression by human vascular endothelial cells." Clin Exp Immunol **112**(3): 464-70.
- Ishizuka, T., S. Sawada, et al. (2000). "Thromboxane A2 (TXA2) receptor blockade suppresses monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) expression by stimulated vascular endothelial cells." Clin Exp Immunol **120**(1): 71-8.
- Isner, J. M., M. Kearney, et al. (1995). "Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis." Circulation **91**(11): 2703-11.
- Itani, S. I., Q. Zhou, et al. (2000). "Involvement of protein kinase C in human skeletal muscle insulin resistance and obesity." Diabetes **49**(8): 1353-8.
- Iwai, N. and T. Inagami (1992). "Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin II receptor." FEBS Lett **298**(2-3): 257-60.
- Iwai, N., S. Tamaki, et al. (1997). "The II genotype of the angiotensin-converting enzyme gene delays the onset of acute coronary syndromes." Arterioscler Thromb Vasc Biol **17**(9): 1730-3.

- Izawa, Y., M. Yoshizumi, et al. (2005). "ERK1/2 activation by angiotensin II inhibits insulin-induced glucose uptake in vascular smooth muscle cells." Exp Cell Res **308**(2): 291-9.
- Jagasia, D. and P. H. McNulty (2003). "Diabetes mellitus and heart failure." Congest Heart Fail **9**(3): 133-9; quiz 140-1.
- Jetton, T. L., J. Lausier, et al. (2005). "Mechanisms of compensatory beta-cell growth in insulin-resistant rats: roles of Akt kinase." Diabetes **54**(8): 2294-304.
- Jiang, Y., D. I. Beller, et al. (1992). "Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes." J Immunol **148**(8): 2423-8.
- Johnson-Tidey, R. R., J. L. McGregor, et al. (1994). "Increase in the adhesion molecule P-selectin in endothelium overlying atherosclerotic plaques. Coexpression with intercellular adhesion molecule-1." Am J Pathol **144**(5): 952-61.
- Joshi, R. L., B. Lamothe, et al. (1996). "Targeted disruption of the insulin receptor gene in the mouse results in neonatal lethality." EMBO J **15**(7): 1542-7.
- Juge-Aubry, C. E., E. Henrichot, et al. (2005). "Adipose tissue: a regulator of inflammation." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **19**(4): 547-66.
- Juhan-Vague, I., M. C. Alessi, et al. (1991). "Increased plasma plasminogen activator inhibitor 1 levels. A possible link between insulin resistance and atherothrombosis." Diabetologia **34**(7): 457-62.
- Kahn, C. R. (1994). "Banting Lecture. Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes." Diabetes **43**(8): 1066-84.
- Kanazawa, K., S. Kawashima, et al. (1996). "Endothelial constitutive nitric oxide synthase protein and mRNA increased in rabbit atherosclerotic aorta despite impaired endothelium-dependent vascular relaxation." Am J Pathol **148**(6): 1949-56.
- Kang, C. and E. Kim "Synergistic effect of curcumin and insulin on muscle cell glucose metabolism." Food Chem Toxicol.
- Kansas, G. S. (1996). "Selectins and their ligands: current concepts and controversies." Blood **88**(9): 3259-87.
- Kaplan, S. A., J. Lin, et al. (2010) "Increased occurrence of marked elevations of lipoprotein(a) in ageing, hypercholesterolaemic men with low testosterone." Aging Male **13**(1): 40-3.
- Kato, H., H. Kashiwagi, et al. (2006). "Adiponectin acts as an endogenous antithrombotic factor." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(1): 224-30.
- Katz, E. B., A. E. Stenbit, et al. (1995). "Cardiac and adipose tissue abnormalities but not diabetes in mice deficient in GLUT4." Nature **377**(6545): 151-5.
- Keidar, S., R. Heinrich, et al. (2001). "Angiotensin II administration to atherosclerotic mice increases macrophage uptake of oxidized ldl: a possible role for interleukin-6." Arterioscler Thromb Vasc Biol **21**(9): 1464-9.
- Kerouz, N. J., D. Horsch, et al. (1997). "Differential regulation of insulin receptor substrates-1 and -2 (IRS-1 and IRS-2) and phosphatidylinositol 3-kinase isoforms in liver and muscle of the obese diabetic (ob/ob) mouse." J Clin Invest **100**(12): 3164-72.
- Khan, B. V., S. S. Parthasarathy, et al. (1995). "Modified low density lipoprotein and its constituents augment cytokine-activated vascular cell adhesion molecule-1 gene expression in human vascular endothelial cells." J Clin Invest **95**(3): 1262-70.
- Kido, Y., D.J. Burks, et al. (2000). "Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2" J Clin Invest **105** (2):199-205

- Kim, J. A., J. A. Berliner, et al. (1996). "Angiotensin II increases monocyte binding to endothelial cells." Biochem Biophys Res Commun **226**(3): 862-8.
- Kim, J. Y., L. A. Nolte, et al. (2000). "High-fat diet-induced muscle insulin resistance: relationship to visceral fat mass." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **279**(6): R2057-65.
- Kimura, T., H. Tomura, et al. (2010) "Mechanism and role of high density lipoprotein-induced activation of AMP-activated protein kinase in endothelial cells." J Biol Chem **285**(7): 4387-97.
- Kishido, T., K. Unno, et al. (2007). "Decline in glutathione peroxidase activity is a reason for brain senescence: consumption of green tea catechin prevents the decline in its activity and protein oxidative damage in ageing mouse brain." Biogerontology **8**(4): 423-30.
- Kohler, H. P. and P. J. Grant (2000). "Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease." N Engl J Med **342**(24): 1792-801.
- Kontush, A., E. C. de Faria, et al. (2005). "A normotriglyceridemic, low HDL-cholesterol phenotype is characterised by elevated oxidative stress and HDL particles with attenuated antioxidative activity." Atherosclerosis **182**(2): 277-85.
- Kopecky, J., G. Clarke, et al. (1995). "Expression of the mitochondrial uncoupling protein gene from the aP2 gene promoter prevents genetic obesity." J Clin Invest **96**(6): 2914-23.
- Kopecky, J., M. Rossmeisl, et al. (1996). "Reduction of dietary obesity in aP2-Ucp transgenic mice: mechanism and adipose tissue morphology." Am J Physiol **270**(5 Pt 1): E776-86.
- Koppenol, W. H., J. J. Moreno, et al. (1992). "Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide." Chem Res Toxicol **5**(6): 834-42.
- Korshunov, S. S., O. V. Korkina, et al. (1998). "Fatty acids as natural uncouplers preventing generation of O₂·- and H₂O₂ by mitochondria in the resting state." FEBS Lett **435**(2-3): 215-8.
- Kralisch, S., G. Sommer, et al. (2007). "Adipokines in diabetes and cardiovascular diseases." Minerva Endocrinol **32**(3): 161-71.
- Kuchan, M. J. and J. A. Frangos (1993). "Shear stress regulates endothelin-1 release via protein kinase C and cGMP in cultured endothelial cells." Am J Physiol **264**(1 Pt 2): H150-6.
- Kulkarni, R. N., J. C. Bruning, et al. (1999). "Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes." Cell **96**(3): 329-39.
- Kuro-o, M. (2008). "Klotho as a regulator of oxidative stress and senescence." Biol Chem **389**(3): 233-41.
- Lafayette, R. A., G. Mayer, et al. (1992). "Angiotensin II receptor blockade limits glomerular injury in rats with reduced renal mass." J Clin Invest **90**(3): 766-71.
- Laing, K. J. and C. J. Secombes (2004). "Chemokines." Dev Comp Immunol **28**(5): 443-60.
- Lameloise, N., P. Muzzin, et al. (2001). "Uncoupling protein 2: a possible link between fatty acid excess and impaired glucose-induced insulin secretion?" Diabetes **50**(4): 803-9.
- Lamers, D., R. Schlich, et al. (2010) "Oleic acid and adipokines synergize in inducing proliferation and inflammatory signaling in human vascular smooth muscle cells." J Cell Mol Med.

- Landmesser, U., R. Merten, et al. (2000). "Vascular extracellular superoxide dismutase activity in patients with coronary artery disease: relation to endothelium-dependent vasodilation." Circulation **101**(19): 2264-70.
- Landmesser, U., S. Dikalov, et al. (2003). "Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension." J Clin Invest **111**(8): 1201-9.
- Lara-Castro, C., Y. Fu, et al. (2007). "Adiponectin and the metabolic syndrome: mechanisms mediating risk for metabolic and cardiovascular disease." Curr Opin Lipidol **18**(3): 263-70.
- Lauro, D., Y. Kido, et al. (1998). "Impaired glucose tolerance in mice with a targeted impairment of insulin action in muscle and adipose tissue." Nat Genet **20**(3): 294-8.
- Laustsen, P. G., M. D. Michael, et al. (2002). "Lipoatrophic diabetes in Irs1(-/-)/Irs3(-/-) double knockout mice." Genes Dev **16**(24): 3213-22.
- Laybutt, D. R., C. Schmitz-Peiffer, et al. (1999). "Muscle lipid accumulation and protein kinase C activation in the insulin-resistant chronically glucose-infused rat." Am J Physiol **277**(6 Pt 1): E1070-6.
- Lee, Y., H. Hirose, et al. (1994). "Beta-cell lipotoxicity in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus of obese rats: impairment in adipocyte-beta-cell relationships." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(23): 10878-82.
- Leeuwenberg, J. F., E. F. Smeets, et al. (1992). "E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 are released by activated human endothelial cells in vitro." Immunology **77**(4): 543-9.
- Lemieux, S., D. Prud'homme, et al. (1996). "Seven-year changes in body fat and visceral adipose tissue in women. Association with indexes of plasma glucose-insulin homeostasis." Diabetes Care **19**(9): 983-91.
- Leone, A. M., R. M. Palmer, et al. (1991). "Constitutive and inducible nitric oxide synthases incorporate molecular oxygen into both nitric oxide and citrulline." J Biol Chem **266**(35): 23790-5.
- Ley, K. (2003). "The role of selectins in inflammation and disease." Trends Mol Med **9**(6): 263-8.
- Li, C., P. Mollahan, et al. (2006). "A comparative study of neovascularisation in atherosclerotic plaques using CD31, CD105 and TGF beta 1." Pathobiology **73**(4): 192-7.
- Li, H., M. I. Cybulsky, et al. (1993). "An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium." Arterioscler Thromb **13**(2): 197-204.
- Li, H., T. Wallerath, et al. (2002). "Regulation of endothelial-type NO synthase expression in pathophysiology and in response to drugs." Nitric Oxide **7**(3): 149-64.
- Libby, P., G. Sukhova, et al. (1995). "Cytokines regulate vascular functions related to stability of the atherosclerotic plaque." J Cardiovasc Pharmacol **25** Suppl 2: S9-12.
- Liu, S. C., Q. Wang, et al. (1999). "Insulin receptor substrate 3 is not essential for growth or glucose homeostasis." J Biol Chem **274**(25): 18093-9.
- Lopez-Franco, O., P. Hernandez-Vargas, et al. (2006). "Parthenolide modulates the NF-kappaB-mediated inflammatory responses in experimental atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(8): 1864-70.
- Loskutoff, D. J., M. Sawdey, et al. (1989). "Type 1 plasminogen activator inhibitor." Prog Hemost Thromb **9**: 87-115.

- Lowell, B. B., S. S. V, et al. (1993). "Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue." Nature **366**(6457): 740-2.
- Luchtefeld, M., K. Grote, et al. (2005). "Angiotensin II induces MMP-2 in a p47phox-dependent manner." Biochem Biophys Res Commun **328**(1): 183-8.
- Lund, D. D., Y. Chu, et al. (2009). "Protective effect of extracellular superoxide dismutase on endothelial function during aging." Am J Physiol Heart Circ Physiol **296**(6): H1920-5.
- Marschang, P., G. J. Friedrich, et al. (2006). "Reduction of soluble P-selectin by statins is inversely correlated with the progression of coronary artery disease." Int J Cardiol **106**(2): 183-90.
- Martin, B. C., J. H. Warram, et al. (1992). "Role of glucose and insulin resistance in development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25-year follow-up study." Lancet **340**(8825): 925-9.
- Martin, W., D. G. White, et al. (1988). "Endothelium-derived relaxing factor and atriopeptin II elevate cyclic GMP levels in pig aortic endothelial cells." Br J Pharmacol **93**(1): 229-39.
- Mateo, T., Y. Naim Abu Nabah, et al. (2007). "A critical role for TNFalpha in the selective attachment of mononuclear leukocytes to angiotensin-II-stimulated arterioles." Blood **110**(6): 1895-902.
- Matsuo, Y., T. Imanishi, et al. (2007). "Effects of plasma adiponectin levels on the number and function of endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease." Circ J **71**(9): 1376-82.
- McEwen, J. E., P. Zimniak, et al. (2005). "Molecular pathology of aging and its implications for senescent coronary atherosclerosis." Curr Opin Cardiol **20**(5): 399-406.
- Meigs, J. B., F. B. Hu, et al. (2004). "Biomarkers of endothelial dysfunction and risk of type 2 diabetes mellitus." JAMA **291**(16): 1978-86.
- Merial, C., A. Bouloumie, et al. (2000). "Nitric oxide-dependent downregulation of adipocyte UCP-2 expression by tumor necrosis factor-alpha." Am J Physiol Cell Physiol **279**(4): C1100-6.
- Michael, M. D., R. N. Kulkarni, et al. (2000). "Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction." Mol Cell **6**(1): 87-97.
- Michel, J. B., O. Feron, et al. (1997). "Caveolin versus calmodulin. Counterbalancing allosteric modulators of endothelial nitric oxide synthase." J Biol Chem **272**(41): 25907-12.
- Michell, B. J., J. E. Griffiths, et al. (1999). "The Akt kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase." Curr Biol **9**(15): 845-8.
- Michell, B. J., M. B. Harris, et al. (2002). "Identification of regulatory sites of phosphorylation of the bovine endothelial nitric-oxide synthase at serine 617 and serine 635." J Biol Chem **277**(44): 42344-51.
- Miki, H., T. Yamauchi, et al. (2001). "Essential role of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and IRS-2 in adipocyte differentiation." Mol Cell Biol **21**(7): 2521-32.
- Miller, V. M. and J. C. Burnett, Jr. (1992). "Modulation of NO and endothelin by chronic increases in blood flow in canine femoral arteries." Am J Physiol **263**(1 Pt 2): H103-8.
- Moncada, S. and E. A. Higgs (1991). "Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance." Eur J Clin Invest **21**(4): 361-74.
- Moncada, S., R. M. Palmer, et al. (1990). "Relationship between prostacyclin and nitric oxide in the thrombotic process." Thromb Res Suppl **11**: 3-13.

- Morel, D. W., P. E. DiCorleto, et al. (1984). "Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation." Arteriosclerosis **4**(4): 357-64.
- Moreno, P. R., E. Falk, et al. (1994). "Macrophage infiltration in acute coronary syndromes. Implications for plaque rupture." Circulation **90**(2): 775-8.
- Morimoto, S., M. D. Cassell, et al. (2002). "The brain renin-angiotensin system in transgenic mice carrying a highly regulated human renin transgene." Circ Res **90**(1): 80-6.
- Moukdar, F., J. Robidoux, et al. (2009). "Reduced antioxidant capacity and diet-induced atherosclerosis in uncoupling protein-2-deficient mice." J Lipid Res **50**(1): 59-70.
- Muller, W. A. (2003). "Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response." Trends Immunol **24**(6): 327-34.
- Nabben, M. and J. Hoeks (2008). "Mitochondrial uncoupling protein 3 and its role in cardiac- and skeletal muscle metabolism." Physiol Behav **94**(2): 259-69.
- Nakashima, Y., E. W. Raines, et al. (1998). "Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse." Arterioscler Thromb Vasc Biol **18**(5): 842-51.
- Napolitano, L. and D. Fawcett (1958). "The fine structure of brown adipose tissue in the newborn mouse and rat." J Biophys Biochem Cytol **4**(6): 685-92.
- Narumiya, S., Y. Sugimoto, et al. (1999). "Prostanoid receptors: structures, properties, and functions." Physiol Rev **79**(4): 1193-226.
- Naruse, K., C. Rask-Madsen, et al. (2006). "Activation of vascular protein kinase C-beta inhibits Akt-dependent endothelial nitric oxide synthase function in obesity-associated insulin resistance." Diabetes **55**(3): 691-8.
- Nobe, K., H. Suzuki, et al. (2003). "High-glucose enhances a thromboxane A2-induced aortic contraction mediated by an alteration of phosphatidylinositol turnover." J Pharmacol Sci **92**(3): 267-82.
- Nouet, S. and C. Nahmias (2000). "Signal transduction from the angiotensin II AT2 receptor." Trends Endocrinol Metab **11**(1): 1-6.
- O'Brien, K. D., T. O. McDonald, et al. (1996). "Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content." Circulation **93**(4): 672-82.
- Oemar, B. S., M. R. Tschudi, et al. (1998). "Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis." Circulation **97**(25): 2494-8.
- Ohashi, M., M. S. Runge, et al. (2006). "MnSOD deficiency increases endothelial dysfunction in ApoE-deficient mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(10): 2331-6.
- Olefsky, J. M. and J. J. Nolan (1995). "Insulin resistance and non-insulin-dependent diabetes mellitus: cellular and molecular mechanisms." Am J Clin Nutr **61**(4 Suppl): 980S-986S.
- Oppenheim, J. J., C. O. Zachariae, et al. (1991). "Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family." Annu Rev Immunol **9**: 617-48.
- Ouchi, N., M. Ohishi, et al. (2003b). "Association of hypoadiponectinemia with impaired vasoreactivity." Hypertension **42**(3): 231-4.
- Ouchi, N., S. Kihara, et al. (2003a). "Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease." Curr Opin Lipidol **14**(6): 561-6.

- Ouedraogo, R., X. Wu, et al. (2006). "Adiponectin suppression of high-glucose-induced reactive oxygen species in vascular endothelial cells: evidence for involvement of a cAMP signaling pathway." Diabetes **55**(6): 1840-6.
- Papapetropoulos, A., G. Garcia-Cardena, et al. (1997). "Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells." J Clin Invest **100**(12): 3131-9.
- Paradis, E., S. Clavel, et al. (2003). "Uncoupling protein 2: a novel player in neuroprotection." Trends Mol Med **9**(12): 522-5.
- Park, J. Y., K. G. Park, et al. (2005). "The effects of the overexpression of recombinant uncoupling protein 2 on proliferation, migration and plasminogen activator inhibitor 1 expression in human vascular smooth muscle cells." Diabetologia **48**(5): 1022-8.
- Park, S., I. S. Ahn, et al. (2010) "Central infusion of leptin improves insulin resistance and suppresses beta-cell function, but not beta-cell mass, primarily through the sympathetic nervous system in a type 2 diabetic rat model." Life Sci.
- Parthasarathy, S. and S. M. Rankin (1992). "Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis." Prog Lipid Res **31**(2): 127-43.
- Pastore, L., A. Tessitore, et al. (1999). "Angiotensin II stimulates intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by human vascular endothelial cells and increases soluble ICAM-1 release in vivo." Circulation **100**(15): 1646-52.
- Pawlowski, N. A., G. Kaplan, et al. (1983). "Arachidonic acid metabolism by human monocytes. Studies with platelet-depleted cultures." J Exp Med **158**(2): 393-412.
- Penn, M. S., G. M. Saidel, et al. (1994). "Relative significance of endothelium and internal elastic lamina in regulating the entry of macromolecules into arteries in vivo." Circ Res **74**(1): 74-82.
- Peterson, M. J., M. C. Morey, et al. (2010) "Walking in Old Age and Development of Metabolic Syndrome: The Health, Aging, and Body Composition Study." Metab Syndr Relat Disord.
- Peti, A., A. Juhasz, et al. (2010) "Relationship of adipokines and non-esterified fatty acid to the insulin resistance in nondiabetic individuals." J Endocrinol Invest.
- Petnehazy, T., D. Cooper, et al. (2006). "Angiotensin II type 1 receptors and the intestinal microvascular dysfunction induced by ischemia and reperfusion." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **290**(6): G1203-10.
- Phillips, M. I. and C. Sumners (1998). "Angiotensin II in central nervous system physiology." Regul Pept **78**(1-3): 1-11.
- Previs, S. F., D. J. Withers, et al. (2000). "Contrasting effects of IRS-1 versus IRS-2 gene disruption on carbohydrate and lipid metabolism in vivo." J Biol Chem **275**(50): 38990-4.
- Properzi, G., G. Terenghi, et al. (1995). "Early increase precedes a depletion of endothelin-1 but not of von Willebrand factor in cutaneous microvessels of diabetic patients. A quantitative immunohistochemical study." J Pathol **175**(2): 243-52.
- Pueyo, M. E., W. Gonzalez, et al. (2000). "Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor-kappaB activation induced by intracellular oxidative stress." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(3): 645-51.
- Quinn, M. T., S. Parthasarathy, et al. (1987). "Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(9): 2995-8.

- Raines, E. W. and R. Ross (1996). "Multiple growth factors are associated with lesions of atherosclerosis: specificity or redundancy?" Bioessays **18**(4): 271-82.
- Rakatzi, I., S. Ramrath, et al. (2003). "A novel insulin analog with unique properties: LysB3,GluB29 insulin induces prominent activation of insulin receptor substrate 2, but marginal phosphorylation of insulin receptor substrate 1." Diabetes **52**(9): 2227-38.
- Randle, P. J., P. B. Garland, et al. (1963). "The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus." Lancet **1**(7285): 785-9.
- Rangaswamy, S., M. S. Penn, et al. (1997). "Exogenous oxidized low-density lipoprotein injures and alters the barrier function of endothelium in rats in vivo." Circ Res **80**(1): 37-44.
- Rask-Madsen, C., Q. Li, et al. (2010) "Loss of insulin signaling in vascular endothelial cells accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E null mice." Cell Metab **11**(5): 379-89.
- Resink, T. J., A. W. Hahn, et al. (1990). "Inducible endothelin mRNA expression and peptide secretion in cultured human vascular smooth muscle cells." Biochem Biophys Res Commun **168**(3): 1303-10.
- Rollins, B. J. (1997). "Chemokines." Blood **90**(3): 909-28.
- Rondinone, C. M., L. M. Wang, et al. (1997). "Insulin receptor substrate (IRS) 1 is reduced and IRS-2 is the main docking protein for phosphatidylinositol 3-kinase in adipocytes from subjects with non-insulin-dependent diabetes mellitus." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(8): 4171-5.
- Rosen, P., X. Du, et al. (1998). "Role of oxygen derived radicals for vascular dysfunction in the diabetic heart: prevention by alpha-tocopherol?" Mol Cell Biochem **188**(1-2): 103-11.
- Ross, R. (1993). "The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s." Nature **362**(6423): 801-9.
- Ross, R. (1999). "Atherosclerosis--an inflammatory disease." N Engl J Med **340**(2): 115-26.
- Rother, K. I., Y. Imai, et al. (1998). "Evidence that IRS-2 phosphorylation is required for insulin action in hepatocytes." J Biol Chem **273**(28): 17491-7.
- Rothwell, N. J. and M. J. Stock (1979). "A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis." Nature **281**(5726): 31-5.
- Rousset, S., M. C. Alves-Guerra, et al. (2004). "The biology of mitochondrial uncoupling proteins." Diabetes **53** Suppl 1: S130-5.
- Ruiz-Ortega, M., O. Lorenzo, et al. (2001). "Role of the renin-angiotensin system in vascular diseases: expanding the field." Hypertension **38**(6): 1382-7.
- Saha, A. K., D. Vavvas, et al. (1997). "Malonyl-CoA regulation in skeletal muscle: its link to cell citrate and the glucose-fatty acid cycle." Am J Physiol **272**(4 Pt 1): E641-8.
- Salt, I. P., V. A. Morrow, et al. (2003). "High glucose inhibits insulin-stimulated nitric oxide production without reducing endothelial nitric-oxide synthase Ser1177 phosphorylation in human aortic endothelial cells." J Biol Chem **278**(21): 18791-7.
- Saltiel, A. R. (2001). "New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes." Cell **104**(4): 517-29.
- Saltiel, A. R. and C. R. Kahn (2001). "Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism." Nature **414**(6865): 799-806.

- Sambrook, J. and M. J. Gething (1989). "Protein structure. Chaperones, paperones." Nature **342**(6247): 224-5.
- Sambrook, J. and M. J. Gething (1989). "Protein structure. Chaperones, paperones." Nature **342**(6247): 248-51.
- Sayeski, P. P. and K. E. Bernstein (2001). "Signal transduction mechanisms of the angiotensin II type AT(1)-receptor: looking beyond the heterotrimeric G protein paradigm." J Renin Angiotensin Aldosterone Syst **2**(1): 4-10.
- Schmitz-Peiffer, C., D. L. Craig, et al. (1999). "Ceramide generation is sufficient to account for the inhibition of the insulin-stimulated PKB pathway in C2C12 skeletal muscle cells pretreated with palmitate." J Biol Chem **274**(34): 24202-10.
- Schrauwen, P., J. Hoeks, et al. (2003). "Uncoupling protein 3 as a mitochondrial fatty acid anion exporter." FASEB J **17**(15): 2272-4.
- Schrauwen, P., M. Mensink, et al. (2006). "Reduced skeletal muscle uncoupling protein-3 content in prediabetic subjects and type 2 diabetic patients: restoration by rosiglitazone treatment." J Clin Endocrinol Metab **91**(4): 1520-5.
- Severson, D. L. (2004). "Diabetic cardiomyopathy: recent evidence from mouse models of type 1 and type 2 diabetes." Can J Physiol Pharmacol **82**(10): 813-23.
- Shoelson, S. E., J. Lee, et al. (2006). "Inflammation and insulin resistance." J Clin Invest **116**(7): 1793-801.
- Siddiqui, A. H. and T. Hussain (2007). "Enhanced AT1 receptor-mediated vasocontractile response to ANG II in endothelium-denuded aorta of obese Zucker rats." Am J Physiol Heart Circ Physiol **292**(4): H1722-7.
- Simionescu, M. (2007). "Implications of early structural-functional changes in the endothelium for vascular disease." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(2): 266-74.
- Simonson, M. S., S. Wann, et al. (1989). "Endothelin stimulates phospholipase C, Na⁺/H⁺ exchange, c-fos expression, and mitogenesis in rat mesangial cells." J Clin Invest **83**(2): 708-12.
- Smith, R. E. and J. C. Roberts (1964). "Thermogenesis of Brown Adipose Tissue in Cold-Acclimated Rats." Am J Physiol **206**: 143-8.
- Smith, W. L., L. J. Marnett, et al. (1991). "Prostaglandin and thromboxane biosynthesis." Pharmacol Ther **49**(3): 153-79.
- Smook, I. W. and S. Branch (2000). "Glut-1 expression and its response to hypoglycemia in the embryonic mouse heart." Anat Embryol (Berl) **201**(5): 327-33.
- Soltys, C. L., S. Kovacic, et al. (2006). "Activation of cardiac AMP-activated protein kinase by LKB1 expression or chemical hypoxia is blunted by increased Akt activity." Am J Physiol Heart Circ Physiol **290**(6): H2472-9.
- Son, C., K. Hosoda, et al. (2004). "Reduction of diet-induced obesity in transgenic mice overexpressing uncoupling protein 3 in skeletal muscle." Diabetologia **47**(1): 47-54.
- Spiekermann, S., U. Landmesser, et al. (2003). "Electron spin resonance characterization of vascular xanthine and NAD(P)H oxidase activity in patients with coronary artery disease: relation to endothelium-dependent vasodilation." Circulation **107**(10): 1383-9.
- Sprengers, E. D. and C. Kluft (1987). "Plasminogen activator inhibitors." Blood **69**(2): 381-7.
- Srinivasan, S. R., L. Myers, et al. (1999). "Temporal association between obesity and hyperinsulinemia in children, adolescents, and young adults: the Bogalusa Heart Study." Metabolism **48**(7): 928-34.
- Stanley, W. C., F. A. Recchia, et al. (2005). "Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart." Physiol Rev **85**(3): 1093-129.

- Stary, H. C. (1994). "Changes in components and structure of atherosclerotic lesions developing from childhood to middle age in coronary arteries." Basic Res Cardiol **89 Suppl 1**: 17-32.
- Steinberg, D. (1997). "Lewis A. Conner Memorial Lecture. Oxidative modification of LDL and atherogenesis." Circulation **95**(4): 1062-71.
- Steinberg, H. O. and A. D. Baron (2002). "Vascular function, insulin resistance and fatty acids." Diabetologia **45**(5): 623-34.
- Storlien, L. H., D. E. James, et al. (1986). "Fat feeding causes widespread in vivo insulin resistance, decreased energy expenditure, and obesity in rats." Am J Physiol **251**(5 Pt 1): E576-83.
- Stuehr, D. J. (1997). "Structure-function aspects in the nitric oxide synthases." Annu Rev Pharmacol Toxicol **37**: 339-59.
- Su, J., P. A. Lucchesi, et al. (2008). "Role of advanced glycation end products with oxidative stress in resistance artery dysfunction in type 2 diabetic mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol **28**(8): 1432-8.
- Taegtmeyer, H., P. McNulty, et al. (2002). "Adaptation and maladaptation of the heart in diabetes: Part I: general concepts." Circulation **105**(14): 1727-33.
- Taegtmeyer, H., R. Hems, et al. (1980). "Utilization of energy-providing substrates in the isolated working rat heart." Biochem J **186**(3): 701-11.
- Tamada, M., S. Makita, et al. (2010). "Low-density lipoprotein cholesterol to high-density lipoprotein cholesterol ratio as a useful marker for early-stage carotid atherosclerosis." Metabolism **59**(5): 653-7.
- Tamemoto, H., T. Kadowaki, et al. (1994). "Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1." Nature **372**(6502): 182-6.
- Tedder, T. F., D. A. Steeber, et al. (1995a). "The selectins: vascular adhesion molecules." FASEB J **9**(10): 866-73.
- Tedder, T. F., D. A. Steeber, et al. (1995b). "L-selectin-deficient mice have impaired leukocyte recruitment into inflammatory sites." J Exp Med **181**(6): 2259-64.
- Terauchi, Y., Y. Tsuji, et al. (1999). "Increased insulin sensitivity and hypoglycaemia in mice lacking the p85 alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase." Nat Genet **21**(2): 230-5.
- Toschi, V., R. Gallo, et al. (1997). "Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques." Circulation **95**(3): 594-9.
- Travis, J. and G. Salvesen (1983). "Control of coagulation and fibrinolysis by plasma proteinase inhibitors." Behring Inst Mitt(73): 56-65.
- Trujillo, M. E. and P. E. Scherer (2005). "Adiponectin--journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome." J Intern Med **257**(2): 167-75.
- Tsukiyama-Kohara, K., F. Poulin, et al. (2001). "Adipose tissue reduction in mice lacking the translational inhibitor 4E-BP1." Nat Med **7**(10): 1128-32.
- Tummala, P. E., X. L. Chen, et al. (1999). "Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculature: A potential link between the renin-angiotensin system and atherosclerosis." Circulation **100**(11): 1223-9.
- Ungar, I., M. Gilbert, et al. (1955). "Studies on myocardial metabolism. IV. Myocardial metabolism in diabetes." Am J Med **18**(3): 385-96.
- van der Wall, E. E., V. M. Cats, et al. (1994). "Acute effects of intravenous nisoldipine on left ventricular function after acute myocardial infarction." Cardiovasc Drugs Ther **8 Suppl 2**: 345-51.
- Vaughan, D. E., S. A. Lazos, et al. (1995). "Angiotensin II regulates the expression of plasminogen activator inhibitor-1 in cultured endothelial cells. A potential link

- between the renin-angiotensin system and thrombosis." *J Clin Invest* **95**(3): 995-1001.
- Vicent, D., J. Ilany, et al. (2003). "The role of endothelial insulin signaling in the regulation of vascular tone and insulin resistance." *J Clin Invest* **111**(9): 1373-80.
- Virkamaki, A., K. Ueki, et al. (1999). "Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance." *J Clin Invest* **103**(7): 931-43.
- Wang, B. and P. Trayhurn (2006). "Acute and prolonged effects of TNF-alpha on the expression and secretion of inflammation-related adipokines by human adipocytes differentiated in culture." *Pflugers Arch* **452**(4): 418-27.
- Wang, Y., K. S. Lam, et al. (2005). "Adiponectin inhibits cell proliferation by interacting with several growth factors in an oligomerization-dependent manner." *J Biol Chem* **280**(18): 18341-7.
- Warram, J. H., B. C. Martin, et al. (1990). "Slow glucose removal rate and hyperinsulinemia precede the development of type II diabetes in the offspring of diabetic parents." *Ann Intern Med* **113**(12): 909-15.
- Wei, M., S. P. Gaskill, et al. (1998). "Effects of diabetes and level of glycemia on all-cause and cardiovascular mortality. The San Antonio Heart Study." *Diabetes Care* **21**(7): 1167-72.
- Wijers, S. L., W. H. Saris, et al. (2009). "Recent advances in adaptive thermogenesis: potential implications for the treatment of obesity." *Obes Rev* **10**(2): 218-26.
- Withers, D. J., D. J. Burks, et al. (1999). "Irs-2 coordinates Igf-1 receptor-mediated beta-cell development and peripheral insulin signalling." *Nat Genet* **23**(1): 32-40.
- Wood, K. M., M. D. Cadogan, et al. (1993). "The distribution of adhesion molecules in human atherosclerosis." *Histopathology* **22**(5): 437-44.
- Xue, B., J. S. Rim, et al. (2007). "Genetic variability affects the development of brown adipocytes in white fat but not in interscapular brown fat." *J Lipid Res* **48**(1): 41-51.
- Yamagishi, H., S. Kim, et al. (1993). "Contribution of cardiac renin-angiotensin system to ventricular remodelling in myocardial-infarcted rats." *J Mol Cell Cardiol* **25**(11): 1369-80.
- Yamagishi, S., H. Adachi, et al. (2009). "Decreased high-density lipoprotein cholesterol level is an independent correlate of circulating tumor necrosis factor-alpha in a general population." *Clin Cardiol* **32**(9): E29-32.
- Yamashita, H., N. Sato, et al. (1992). "Insulin administration induces capillary growth in brown adipose tissue of heat-exposed rats." *Comp Biochem Physiol Comp Physiol* **103**(4): 673-8.
- Yang, R. H., H. Jin, et al. (1992). "Depressor effect of blocking angiotensin subtype 1 receptors in anterior hypothalamus." *Hypertension* **19**(5): 475-81.
- Yla-Herttuala, S., B. A. Lipton, et al. (1991). "Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(12): 5252-6.
- Young, M. E., P. McNulty, et al. (2002). "Adaptation and maladaptation of the heart in diabetes: Part II: potential mechanisms." *Circulation* **105**(15): 1861-70.
- Yun, M. R., J. Y. Lee, et al. (2006). "Oleic acid enhances vascular smooth muscle cell proliferation via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway." *Pharmacol Res* **54**(2): 97-102.
- Zhang, C. Y., G. Baffy, et al. (2001). "Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes." *Cell* **105**(6): 745-55.

- Zhou, Y. T., P. Grayburn, et al. (2000). "Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(4): 1784-9.
- Zibara, K., E. Chignier, et al. (2000). "Modulation of expression of endothelial intercellular adhesion molecule-1, platelet-endothelial cell adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in aortic arch lesions of apolipoprotein E-deficient compared with wild-type mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(10): 2288-96.
- Zoico, E., A. Rossi, et al. (2010) "Adipose tissue infiltration in skeletal muscle of healthy elderly men: relationships with body composition, insulin resistance, and inflammation at the systemic and tissue level." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **65**(3): 295-9.